

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und
Klinische Immunologie
der Medizinischen Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Entwicklung eines bioartifiziellen
Trachealersatzes: Charakterisierung
humaner respiratorischer
Epithelzellen in Expansions- und
Differenzierungskulturen**

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor rerum medicarum (Dr. rer. medic)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité-
Universitätsmedizin Berlin

von
Michaela Endres
aus Leverkusen

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1.: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. M. Sittinger

2.: Prof. Dr. med. Th. Skutella

3.: Priv.-Doz. Dr. med N. Rotter

Datum der Promotion: 26.09.2005

Kurzfassung:

Verschiedene Ursachen erfordern rekonstruktive Maßnahmen an der Trachea zur Erhaltung eines suffizienten Luftweges. Häufig treten im Rahmen dieser Eingriffe Infektionen und Schädigungen auf, die die Bildung von Granulationsgewebe nach sich ziehen und zu Stenosen führen können. Der Einsatz von epithelialisierten autogenen oder auch allogenen Transplantaten, die mit der Methode des Tissue Engineering hergestellt werden, bietet einen neuen Lösungsansatz, um Stenosen zu vermeiden. Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung von humanem respiratorischen Epithelzellen (hREC), sowie deren Einsatz in Co-Kulturen mit humanen Chondrozyten als einen ersten Schritt zur Transplantatherstellung. Die hREC wurden sowohl in nativem Gewebe als auch in Monolayerkultur und in verschiedenen Differenzierungskulturen histologisch und immunhistochemisch analysiert. Zusätzlich wurde die Ziliogenese mit der Elektronenmikroskop untersucht. Eine weitere Charakterisierung erfolgte durch die Genexpressionsanalyse einiger Cytokeratine auf RNA-Ebene mit der semiquantitativen real-time RT-PCR. Mittels Durchflusszytometrie konnten Basalzellen, die auch als Vorläuferzellen des humanen respiratorischen Epithels gelten, mit den Antikörpern CD49f und CD104 detektiert und analysiert und unter Verwendung der fluoreszenzaktivierten Zellsortierung (FACS) separiert werden.

Es zeigte sich, dass die hREC in den Proliferationskulturen dedifferenzierten und durch spezielle Basalzellmarker angefärbt wurden. Die Differenzierungskulturen und ALI-Kulturen gaben erste Hinweise auf die Differenzierung der Zellen. In den Co-Kulturen konnte unter dem Einfluß eines Air-Liquid-Interface ebenfalls eine Re-differenzierung der Zellen beobachtet werden. Die Ergebnisse zeigen, dass es möglich ist, eine Epithelialisierung von kollagenbeschichteten Biomaterialien oder auch autologem Knorpel zu erreichen, um diese Konstrukte für das Trachea Tissue Engineering einzusetzen.

Abstract

The replacement of extensive tracheal defects resulting from intensive care medicine, trauma, or large resections is still challenged by the re-epithelialization of an autologous or alloplastic trachea replacement. Therefore, this thesis was performed to investigate the potential of culture expanded human respiratory epithelial cells (hREC) to regenerate a functional epithelium for trachea tissue engineering.

hREC from nasal turbinates were freshly isolated, expanded and subsequently cultured in high-density multilayers to allow epithelial differentiation. Composition of epithelial cells in native respiratory epithelial tissue and culture expanded hREC were analyzed by histological staining and by immunohistochemical staining with the specific antibodies. Differentiation of culture expanded hREC was further characterized by gene expression analysis of a cytokeratin pattern using semi-quantitative real-time RT-PCR technique. Furthermore, basal cells known as progenitors of the respiratory epithelium were separated by Fluorescence Activated Cell Sorting with the basal cell specific antibodies CD49f and CD104. Co-cultures of hREC and human chondrocytes (hCHO) or human cartilage respectively were compared to Air-Liquid-Interface cultures containing hREC and hCHO. Histological and immunohistochemical staining and Scanning Electron Microscopy pictures of hREC in differentiation cultures demonstrated basal cells covering the collagenous matrix. These cells formed a cellular multilayer, which is composed of a basal layer of undifferentiated basal cells and an upper layer of cells differentiating along the squamous metaplasia and ciliated cell lineage. Lineage development of cultured hREC was further documented by the induction of specific cytokeratins. Our results suggest that culture expanded hREC have the potential to colonize collagen coated biomaterials as well as autologous cartilage grafts and to regenerate epithelial cell types for trachea tissue engineering.

Schlagworte

Schlagworte:

Gewebezüchtung

Trachealersatz

Respiratorische Epithelzellen

Lufttröhre

Co-Kulturen

Zellkultur

Keywords:

Tissue Engineering

Tracheal replacement

Respiratory Epithelial Cells

Trachea

Co-Cultures

Cell Culture

Danksagung

Der erste Dank soll an meine Eltern gehen, die mich immer in meinen Vorhaben bestärkten und unterstützt haben.

PD Dr. Michael Sittinger danke ich herzlichst für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe Tissue Engineering wissenschaftlich zu arbeiten, für die Überlassung des Themas und die Betreuung.

Mein besonderer Dank gilt Iris Leinhase und Johanna Golla für die Hilfe und die unterhaltsamen Stunden innerhalb und außerhalb des Labors.

Für die Hilfe bei der Auswertung der molekularbiologischen Ergebnisse und Statistiken möchte ich Dr. Christian Kaps und Dr. Thomas Häupl danken.

Danken möchte ich auch Dr. Heidi Olze und Dr. Alexander Loch, für die Bereitstellung der Gewebeproben. Dr. Marek Wentges und Dr. Nicole Rotter möchte ich dafür danken, dass ich ihnen zu medizinischen Fachtermini Löcher in den Bauch fragen durfte.

Im Kampf gegen die Tücken des Computers stand mir Samuel Vetterlein mit Rat und Tat zur Seite, dafür möchte ich mich bedanken.

Ein großer Dank geht an Herrn Jürgen Landskron von der Technischen Fachhochschule Berlin, für die umfassende Einweisung und Assistenz am Rasterelektronenmikroskop sowie für die ständige Versorgung mit Hustenbonbons.

Ein riesiges Dankeschön geht an das gesamte Tissue Engineering Team für die Unterstützung und Hilfe.

Besonderer Dank gilt Kolja Zwierzynski für seine Geduld und Unterstützung.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	16
1.1	Tissue Engineering.....	16
1.2	Aufbau der humanen Trachea	18
1.3	Das humane respiratorische Epithel	20
1.4	Pathologie der Trachea und Ansätze zur Trachealrekonstruktion.....	21
1.5	Conchae nasales (Nasenschnecken)	23
1.6	Zellkultursysteme für respiratorische Zellen.....	24
1.7	Genexpressionsmarker für respiratorische Epithelzellen	25
1.8	Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	26
1.8.1	Grundlagen der PCR.....	26
1.8.2	Genexpressionsanalysen auf RNA Ebene.....	27
1.8.3	Quantitative und semiquantitative real-time RT-PCR.....	28
1.9	Durchflußzytometrie	32
1.9.1	Polyklonale Antikörper.....	33
1.9.2	Monoklonale Antikörper	33
1.10	Aufgabenstellung und Ziel der Arbeit.....	34
2	MATERIAL.....	35
2.1	Reagenzien und Lösungen	35
2.1.1	Zellkultur.....	35
2.1.2	Molekularbiologie.....	35
2.1.3	Histologie, Immunhistochemie, Durchflußzytometrie und Mikroskopie	36
2.2	Geräte	37
2.2.1	Zellkultur.....	37
2.2.2	Molekularbiologie.....	38
2.2.3	Histologie, Immunhistochemie, Durchflußzytometrie und Mikroskopie	39
2.3	Nährmedien für die Zellkultur.....	39
3	METHODEN	41

3.1	Isolierung und Kultivierung von humanen respiratorischen Epithelzellen.....	41
3.2	Isolierung und Kultivierung von humanen Chondrozyten aus Nasensepten	42
3.3	Isolierung und Kultivierung von humanen Chondrozyten aus dem Kniegelenk	42
3.4	Isolierung und Kultivierung von humanen Fibroblasten	43
3.5	Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung	43
3.6	Passagieren von Zellen aus Monolayerkulturen	44
3.7	Differenzierungskulturen von humanen respiratorischen Epithelzellen in Zellkulturflaschen.....	44
3.8	Air-Liquid-Interface Kulturen von humanen respiratorischen Epithelzellen.....	45
3.9	Hochdichte-Pelletkulturen aus humanen Chondrozyten.....	46
3.10	Gesamt-RNA Isolation	46
3.10.1	Gesamt-RNA Isolation aus humanen respiratoischen Epithelzellen in Monolayerkulturen.....	46
3.10.2	Gesamt-RNA Isolation aus Air-Liquid-Interface-Kulturen	47
3.11	Bestimmung des Gesamt-RNA Gehalts	47
3.12	cDNA-Synthese.....	48
3.13	Real-time RT-PCR.....	48
3.13.1	Auswertung der real time RT-PCR	50
3.14	Durchflusszytometrische Analysen.....	50
3.14.1	Vorbereitung der Zellen.....	50
3.14.2	Antikörperfärbung.....	50
3.14.3	Vorarbeiten am Durchflusszytometer und Messung der Proben.....	51
3.14.4	Gwinnung der Basalzellen durch FACS	52
3.15	<i>In vitro</i> Co-Kultursysteme.....	52
3.15.1	Co-Kultivierung von respiratorischen Epithelzellen und nativem Gelenkknorpel.....	52
3.15.2	Co-Kultivierung von respiratorischen Epithelzellen und <i>in vitro</i> gezüchteten Knorpelpellets	53
3.15.3	Co-Kultivierung von respiratorischen Epithelzellen und humanen Knorpelzellen auf Kollagenmembranen.....	53

3.15.4	Herstellung von Co-Kulturen aus nativen humanen Gelenkknorpelchips und humanen respiratorischen Epithelzellen.....	54
3.16	Immunhistochemische und histologische Untersuchungen	54
3.16.1	Kryo-Einbettung des Probenmaterials und Anfertigung von Kryoschnitten ...	54
3.16.2	Fixierung von Air-Liquid-Interface und Chamber Slides Kulturen.....	55
3.16.3	Alcian-Blau-Färbung	55
3.16.4	Masson-Goldner Trichrom Färbung.....	56
3.16.5	Hämatoxylin / Eosin Färbung	56
3.16.6	Immunhistochemische Färbungen.....	57
3.17	Rasterelektronenmikroskopie	58
4	ERGEBNISSE	60
4.1	Kultivierung von humanen respiratorischen Epithelzellen.....	60
4.2	Durchflusszytometrie.....	62
4.3	Differenzierung und Charakterisierung von humanen respiratorischen Epithelzellen in Zellkulturflaschen.....	65
4.3.1	Histologie	67
3.3.2.	Immunhistochemie.....	68
4.4	Differenzierung und Charakterisierung von humanen respiratorischen Epithelzellen im Air Liquid Interface	73
4.5	Nachweis von Zilien im Rasterelektronenmikroskop	76
4.6	Genexpressionsanalysen.....	77
4.6.1	Auswahl und Design von Oligonukleotiden	77
4.6.2	Quantifizierung und Reinheitsbestimmung der Gesamt-RNA und cDNA Synthese.....	78
4.6.3	Real time RT-PCR Analysen.....	79
4.6.4	hREC Differenzierungskulturen im Monolayer.....	80
4.6.5	REC Differenzierungskulturen im Air-Liquid-Interface	82
4.7	Co-Kulturen.....	83
4.7.1	Co-Kulturen aus Epithelzellen und <i>in vitro</i> hergestellten Hochdichte-Chondrozytenpellets	83
4.7.2	Co-Kulturen aus Epithelzellen und nativen humanem Gelenkknorpel.....	85
4.7.3	Co-Kultivierung von respiratorischen Epithelzellen und humanen	

	Knorpelzellen im Air-Liquid-Interface	87
5	DISKUSSION.....	93
5.1	Molekularbiologische Charakterisierung der hREC	98
5.2	Co-Kulturen.....	99
5.3	Ausblick und Perspektiven	101
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	103
7	LITERATURVERZEICHNIS	105

Abbildungsverzeichnis

Abbildungen

Abb. 1: Konstruktiver Bau des Trachealrohrs [30]	19
Abb. 2: Humanes respiratorisches Epithel; A Masson-Goldner Färbung; B HE- Färbung. (*)	
Basalmembran, (#) Basalzellen	21
Abb. 3: Nasenhöhle im Sagitalschnitt [47]	23
Abb. 4: Programmschema eines PCR Laufs (i-Cykler, BioRad)	28
Abb. 5: Beispiel für aufgenommene real-time PCR Daten	29
Abb. 6: Schematische Darstellung eines PCR Zyklus bei Verwendung von SYBR Green. A	
Denaturierung; B Annealing; C Elongation; D PCR Produkt [73] (modifiziert)	30
Abb. 7: Darstellung einer Schmelzkurvenanalyse; A ein Produkt; B zwei Produkte	31
Abb. 8: Kollagenmembraneinsatz für die Air-Liquid Interface Kultur	45
Abb. 9: Gewebeschnitt einer Nasenmuschel; A vor dem Verdau; B nach dem Verdau;	
Hämatoxylin Färbung; 400fach vergrößert	60
Abb. 10: Proliferationsverhalten der primären humanen respiratorischen Epithelzellen; A 8h; B	
20h; C 1 Tag; D 4 Tage in Kultur	61
Abb. 11: Morphologie der humanen respiratorischen Epithelzellen, 5 Tage in Kultur; A P0; B	
P1; C P2; D P3	62
Abb. 12: FACS Analyse primärer hREC. A Gesamtpopulation mit Gate R1, B mit PI gefärbte	
Zellen aus Gate R1, vitale Zellen (78%) im Gate R2, C Färbung der vitalen Zellen mit	
CD104-PE, D Färbung der vitalen Zellen mit CD49f-PE	64
Abb. 13: FACS von primären hREC. A Setzen des Gates P1 um vitale Zellen der PI/DAPI	
gefärbten Zellpopulation (P1), B vitale CD104-PE positiv markierte Zellen im Gate P2	
und unmarkierte Zellen im Gate P3	65
Abb. 14: Differenzierungskulturen in Zellkulturflaschen; A 100%ige Konfluenz (Tag 0); B	
Tag 4 nach Konfluenz; C Tag 8 nach Konfluenz; D Tag 12 nach Konfluenz	66
Abb. 15: Alcian-Blau Färbung des respiratorischen Epithels von humanen Nasenmuscheln; A	
Becherzellen mit Zilien; B Differenzierungskultur P0; C Differenzierungskultur P1; D	
Differenzierungskultur P2	68
Abb. 16: Immunhistochemische Färbung des humanen respiratorischen Epithels von	
Nasenmuscheln mit dem 34 β E12 AK; A Übersicht; B Basalzellen (\rightarrow), Becherzellen	
(BZ); C und D Negativkontrolle	69
Abb. 17: Immunhistochemische Färbung von Zellkulturen des humanen respiratorischen	
Epithels aus Nasenmuscheln mit dem AK 34 β E12; A primäre Zellen; B P1; C P2; D P3	
.....	70

Abb. 18: Immunhistochemische Färbung des humanen respiratorischen Epithels aus Nasenmuscheln mit dem CD44v6 AK (A); Negativkontrolle (B).....	71
Abb. 19: Immunhistochemische Färbung von hREC-Kulturen mit dem AK CD44v6; A Übersicht P0; B Ausschnitt P0; C Übersicht P1; D Ausschnitt P1.....	71
Abb. 20: A Färbung des humanen respiratorischen Epithels der Nasenmuschel mit dem CD49f Antikörper. B Negativkontrolle	72
Abb. 21: A Färbung des humanen respiratorischen Gewebes der Nasenmuschel mit dem CD104 Antikörper. B Negativkontrolle	73
Abb. 22: hREC-Kultur P1 im Air-Liquid-Interface; A 100%ige Konfluenz Tag 0; B 4 Tage nach Konfluenz; C 8 Tage nach Konfluenz; D 12 Tage nach Konfluenz	74
Abb. 23: Immunhistochemische Färbung der hREC im ALI mit dem 34ßE12 AK A 100%ige Konfluenz (Tag 0); B 4 Tage nach Konfluenz; C 8 Tage nach Konfluenz; D 12 Tage nach Konfluenz.....	75
Abb. 24: Immunhistochemische Färbung von hREC mit dem AK CD44v6 im ALI; A 100%ige Konfluenz; B 4 Tage nach Konfluenz; C 8 Tage nach Konfluenz; D 12 Tage nach Konfluenz	75
Abb. 25: REM-Aufnahmen von nativen Nasenmuscheln; A respiratorisches Epithel mit Flimmerzellen und Erythrozyten (Übersicht); B Oberfläche des Gewebes mit Zilien bedeckt.....	76
Abb. 26: REM- Aufnahmen von hREC (P1) im ALI; A 100% Konfluenz (d0) Zell-Zellkontakte, B 4 Tage Mikrovilli, C 8 Tage kugelförmige hREC, D 12 Tage Zilien	77
Abb. 27: Differenzierungskultur; Darstellung der relativen Genexpression als Vielfaches von GAPDH (fold change) über die Kulturdauer in Tagen (day) als Box-Wisker-Plot; A CK5; B CK13; C CK14; D CK18	81
Abb. 28: Differenzierungskultur im ALI; Darstellung der relativen Genexpression als Vielfaches von GAPDH (fold change) über der Kulturdauer in Tagen (day) als Box-Wisker-Plot; A CK5; B CK13; C CK14; D CK18	83
Abb. 29: Alcian-Blau-Färbung von humanen Chondrozyten-pellets nach 7 Tagen Differenzierungskultur. A mit TGF-ß1, B ohne TGF-ß1	84
Abb. 30: Humane Chondrozytenpellets mit hREC besiedelt. A 7 Tage in AECG-Medium 34ßE12 gefärbt, B 7 Tage in AECG-Medium, CD44v6 gefärbt, C 7 Tage in konditioniertem Medium, 34ßE12 gefärbt, D 14 Tage in konditioniertem Medium, 34ßE12 gefärbt. Gegenfärbung Alcian-Blau.....	85
Abb. 31: Immunhistochemische Färbung von humanen respiratorischen Epithelzellen auf nativem Knorpelchips. A 34ßE12 AK Tag 7; B CD44v6 AK Tag 7; C 34ßE12 AK Tag 14; D CD44v6 AK Tag 14.....	86

Abb. 32: REM- Aufnahmen von Knorpelchips besiedelt mit humanen respiratorischen Epithelzellen Tag 14. A Übersicht mit abgekugelten Zellen, B Multilayerwachstum; C/D Zellen mit glatter und lamellenartiger Oberfläche.....	87
Abb. 33: Immersionskultur von hREC und humanen Chondrozyten auf einer Kollagenmembran, A hREC mit 34ßE12 gefärbt, B hREC mit CD44v6 gefärbt	88
Abb. 34: Air-Liquid-Interface Kultur von hREC und humanen Chondrozyten auf einer Kollagenmembran Tag 8. A hREC mit 34ßE12 gefärbt, B hREC mit CD44v6 gefärbt..	89
Abb. 35: Air-Liquid-Interface Kultur von hREC und humanen Chondrozyten auf einer Kollagenmembran mit konditioniertem Medium; mit 34ßE12 gefärbt: A Tag 4, C Tag 8, E Tag 12; mit CD44v6 gefärbt: B Tag 4, D Tag 8, F Tag 12.	91
Abb. 36: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von hREC auf Kollagenmembranen kultiviert mit konditioniertem Medium Tag 12.....	92

Tabellen

Tab. 1: Auflistung der verwendeten Oligonukleotide für die real-time RT-PCR.....	49
Tab. 2: Antikörperverdünnung für die Färbung der hREC für die Analyse am Durchflusszytometer	51
Tab. 3: Antikörperverdünnung für die immunhistochemische Färbung der hREC.....	58

Abkürzungsverzeichnis

AECGM	Airway Epithelial Cell Growth Medium
ALI	Air-Liquid-Interface
AK	Antikörper
BCP	1-Bromo-3-chlorpropan
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	copy-DNA
CK	Zytokeratin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
dATP	Desoxiadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytisintriphosphat
DEPC	Diethyl-pyrocbonat
dest. Wasser	Destilliertes Wasser
dGTP	Desoxiguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonucleic Acid)
DTT	Dithiothreol
dTTP	Desoxitymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
FSC	Forward-Scatter
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
hREC	Humane respiratorische Epithelzellen (Human Respiratory Epithelial Cells)
mRNA	Boten RNA (messenger RNA)
OD	Optische Dichte
P 1	Erste Passage
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (Phosphat Buffered Saline)
PCL	Polycaprolacton
PCR	Polymerase Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)

Abkürzungsverzeichnis

P/S	Penicillin/Streptomycin
PGA	Polyglycolic acid
PGLA	Polyglycolic acid/polylactid acid Co-Polymer
PLA	Polylactid acid
PI	Prpidiumiodid)
RNA	Ribonukleinsäure (Ribonucleic Acid)
RNase	Ribonuklease
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
SSC	Side-Scatter
ssRNA	Einzelstrang RNA (Single strand RNA)
TE-Puffer	Tris-EDTA Pufferlösung
U	Units

1 Einleitung

1.1 Tissue Engineering

Das Tissue Engineering beruht auf der Herstellung von bioartifiziellen Konstrukten oder Geweben, die aus vitalen Zellen bzw. einer Zellmatrix und biokompatiblen Trägermaterialien bestehen [1].

Das Prinzip des Tissue Engineerings beinhaltet zunächst die Entnahme einer kleinen Gewebeprobe, die nur geringe Mengen an Ausgangszellen liefert, die aus dem Gewebeverband herausgelöst und *in vitro* vermehrt werden. Diese Primärzellen können in geeignete Trägermaterialien eingebracht werden, indem sie durch Zugabe einer Gelkomponente im Trägermaterial immobilisiert werden [2]. Als Gelkomponenten kommen folgende Hydrogele in Frage: Agarose [3], Fibrin [4], Alginat [4], Hyaluronsäure [4] sowie Chitosan [5]. Für den Einsatz von Hydrogelen im Tissue Engineering ist in erster Linie die Resorptionszeit von großer Bedeutung. Eine zu schnelle Resorption führt dazu, dass Hydrogel, welches als temporäre Matrix und zur homogenen Verteilung der Zellen im Trägermaterial dient, seine Funktion nicht über einen ausreichend langen Zeitraum beibehält. Die Folge könnte eine inhomogene Verteilung der Zellen im Trägermaterial sein, da die Schwerkraft die Zellen in den unteren Teil des Trägermaterials zieht [1]. Zudem ist die klinische Zulassung des verwendeten Hydrogels im Hinblick auf eine spätere klinische Anwendung unerlässlich.

Eine Vielzahl von resorbierbaren und auch nichtresorbierbaren Biomaterialien bieten sich als Trägermaterialien an. Als Standard beim Herstellen von Knorpelgeweben mit Hilfe des Tissue Engineering gilt zur Zeit die Verwendung von resorbierbaren Polymeren wie z.B. Polyglycolic Acid (PGA) [6], Polylactid Acid (PLA) [7], einem Gemisch aus PGA und PLA in verschiedenen Anteilen [8], das Copolymer (PGLA) [9] sowie Poly(ϵ -caprolacton) (PCL) [10], wobei auch natürliche, resorbierbare Trägermaterialien wie z.B. das Kollagen [11] Verwendung finden.

Mit der Methode des Tissue Engineering wurde im Laufe der letzten 18 Jahre versucht, eine Vielzahl von menschlichen Geweben zu rekonstruieren.

Herausragende Resultate sind im Bereich des Hautersatzes sowie bei der Knochen- und Knorpelrekonstruktion erzielt worden, sodass in den genannten Arbeitsfeldern bereits die klinische Anwendung erfolgt. Die Herstellung von anderen Organen, z.B. die der Leber [12], der Niere [13], die schon allein durch ihren diffizilen Aufbau als eher schwierige Forschungsobjekte anzusehen sind, befindet sich noch in einer experimentellen Phase.

Die Anwendung des Tissue Engineering bei der Rekonstruktion des Trachealgewebes ist noch ein junges Forschungsfeld. Nach wie vor existieren verhältnismäßig wenige Studien, die Methoden des Tissue Engineering zur Herstellung eines Trachealersatzes *in vitro* oder *in vivo* anwenden. Die 1994 von Vacanti et al. vorgestellten Studien, in denen Konstrukte aus bovinen Chondrozyten und Trachealzellen mit einem mechanisch stabilisierenden Material aus PGA hergestellt, bzw. zirkumferente Trachealdefekte bei Ratten mit *in vitro* hergestellten Konstrukten geschlossen wurden, sind weiterhin wegweisend [14]. In einer anschließenden Studie wurden respiratorische Epithelzellen isoliert und in gezüchtete Knorpelzylinder gespritzt [15]. Untersuchungen an diesen Konstrukten ergaben reifes Knorpelgewebe sowie epitheliale Strukturen mit submukosalem Bindegewebe. Das Lumen wies vereinzelt verschiedene Stufen eines mehrreihigen hochprismatischen Epithels mit einigen Flimmerzellen auf, die nach 3 Wochen Kultur beobachtet werden konnten [15]. In einem weiterführenden Versuch dieser Arbeitsgruppe ist es gelungen, einen Trachealersatz bestehend aus Chondrozyten und Fibroblasten in Schafe zu transplantieren, die nach dem Eingriff zwei bis sieben Tage überlebten [16]. Eine Funktionalität der generierten Trachea hinsichtlich der Ausbildung von Kinozilien innerhalb des respiratorischen Epithels konnte nicht gezeigt werden.

Bücheler et al. untersuchten 2000 die Besiedelung von Kollagenvliesen mit humanen respiratorischen Epithelzellen. Durch das Auswachsen von Epithelzellen aus humanen Nasenschleimhautexplantaten konnte eine vollständige Epithelisierung nach fünf bis zehn Tagen beobachtet werden. Des Weiteren fanden sich aktive Zilien, die auch bis zum Versuchsende (acht Wochen) aktiv blieben. Jedoch gibt es keinen Anhaltspunkt dafür, dass funktionelle vitale Trachealprothesen mit

ausreichender Stabilität für den klinischen Bereich hergestellt werden konnten [17].

Die Studien von Vacanti und Sakata zeigten, dass in Tierversuchen die Trachealrekonstruktion über Tage hinweg funktionierte. Dagegen konnte im humanen Bereich bisher nicht gezeigt werden, dass eine Trachealröhre mit genügenden biomechanischen Eigenschaften und mit einem funktionellen respiratorischen Epithel ausgekleidet, hergestellt werden konnte. Es fehlt an ausreichender Charakterisierung der humanen respiratorischen Zellen während der Reepithelialisierung von Transplantaten. Bisher wurden nur wenige Untersuchungen zu möglichen Mechanismen der Differenzierung und Regeneration des respiratorischen Epithels im Zusammenhang mit dem Tissue Engineering durchgeführt. Die bereits durchgeführten Untersuchungen zu den Differenzierungsmechanismen des respiratorischen Epithels gehen von anderen Fragestellungen aus, wie die der Differenzierung in der Embryonalphase [18, 19] und der Differenzierung der respiratorischen Epithelzellen aus Vorläuferzellen [20, 21, 22].

Untersuchungsergebnisse haben ergeben, dass humane tracheale Basalzellen die möglichen Vorläuferzellen des respiratorischen Gewebes sind [20]. Mit spezifischen Lectin-Markern [23, 24] und mit Hilfe der Durchflusszytometrie [25] können Basalzellen von den differenzierten Zellen unterschieden werden. Zytokeratine spielen hierbei eine wichtige Rolle als Differenzierungsmarker und als Tumormarker. Weiterhin konnte die Charakterisierung der Zytokeratine mittels Immunhistochemie und der 2D-Gelelektrophorese [26, 27] wichtige Aufschlüsse über die Entwicklung des humanen respiratorischen Epithels geben.

1.2 Aufbau der humanen Trachea

Unter dem Larynx setzt sich der Respirationstrakt als Luftröhre (Trachea) fort. Die Trachea ist eine 10-13cm lange, steife, schlauchartige Struktur mit einem Durchmesser von 2-3cm. Sie tritt in der Medianebene in den Thorax ein und teilt sich dort in die beiden Bronchi principales (Hauptbronchien), die die rechte bzw. linke Lunge mit Luft versorgen [28].

Die elastische Trachealwand wird durch 15-20 hufeisenförmige Knorpelspangen aus hyalinem Knorpel stabilisiert, sodass sie nicht kollabieren oder überdehnt werden kann. Auf einem schmalen Streifen sind die Knorpelspangen offen. Der dorsale Spalt zwischen den einzelnen Knorpelenden wird durch ein stabiles, kollagenfaserhaltiges Band mit vielen elastischen Fasern und Bündeln glatter Muskulatur geschlossen, wodurch eine gewisse Verengung des Trachealvolumens möglich ist. Die einzelnen Knorpelspangen sind durch Bindegewebszüge (Ligamenta annularia), die ebenfalls reich an Kollagen und elastischen Fasern sind, miteinander verbunden (Abb. 1). Diese Konstruktion erlaubt Schwankungen in der Länge der Trachea von 2-3cm, wie sie durch die Anhebung des Kehlkopfes mitsamt des kranialen Trachealendes beim Schluckvorgang notwendig sind [29].

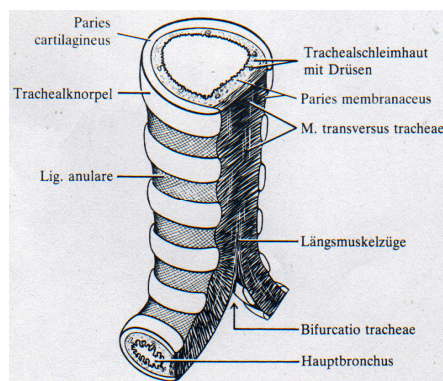


Abb. 1: Konstruktiver Bau des Trachealrohrs [30]

Das Lumen der Trachea wird von einer Schleimhaut ausgekleidet, die aus einem hochprismatischen Epithel mit Becherzellen, Flimmerzellen und Basalzellen besteht. Die Zellen sind alle mit der gut ausgebildeten Basalmembran verbunden. Unterhalb der Basalmembran schließt sich die Lamina propria mit elastischen Fasern und darunter die Submukosa mit zahlreichen seromukösen Drüsen an [29].

1.3 Das humane respiratorische Epithel

Das respiratorische Epithel der Trachea besitzt einen ähnlichen histologischen Aufbau wie das Epithel der Nasenschleimhaut [31]. Die zelluläre Zusammensetzung und die Funktionen der einzelnen Zellarten des mehrreihigen Flimmerepithels wurden weitestgehend geklärt. Das respiratorische Epithel der Trachea setzt sich aus Basalzellen, die durch Hemidesmosomen an die kollagenreiche Basalmembran geheftet sind (Abb .2A), den Zilienzellen (Transport von Partikeln und Schleim) und den Becherzellen (Schleimproduktion) zusammen (Abb .2B). Von den drei Zellarten des tracheobronchialen Epithels sind die Basalzellen und die sekretorischen Zellen in der Lage sich zu teilen, während die ziliären Zellen als terminal differenziert und teilungsinaktiv gelten [25]. Das die Trachea auskleidende mehrreihige Flimmerpithel ist dadurch gekennzeichnet, dass alle Zellen im Zellverband Kontakt zur Basalmembran besitzen, wobei Zilienzellen und Becherzellen nur eine minimale Kontaktfläche aufweisen [21] und mit Desmosomen an benachbarte Zellen binden können [32, 33]. Es erreichen jedoch nicht alle Zellen die Oberfläche, wie die Basalzellen, die neben ihrer Rolle als Progenitorzellen auch die Verankerung des respiratorischen Epithels an die Basalmembran stabilisieren [20]. Basalzellen bilden eine Stammzellpopulation für die anderen Zellarten und besitzen eine eher runde Morphologie. Ihr Zellkern befindet sich in unmittelbarer Nähe zur Basalmembran [28].

Die Flimmerzellen stellen bis zu 60% der im respiratorischen Epithel enthaltenen Zellen [29]. Jede dieser Flimmerzellen trägt ca. 200-300 Zilien und interponierte Mikrovilli [34]. Die Kinozilien sind mit einem Basalkörperchen verankert und bestehen aus neun Mikrotubuluspaaren, die zwei eigenständige Mikrotubuli in der Mitte umgeben. Zusammen mit einigen weiteren Proteinen dienen die Mikrotubuli dazu, aus chemischer Energie durch Hydrolyse von ATP mechanische Energie zu gewinnen. Die Frequenz des Zilienschlags beträgt ca. 12-15 Schläge pro Sekunde [29].

Becherzellen sind vereinzelt zwischen den Flimmerepithelzellen lokalisiert. Sie enthalten polysaccharidhaltige Schleimtröpfchen, die nach Absonderung einen zusammenhängenden Mukus Film über den Zilien bilden [34].

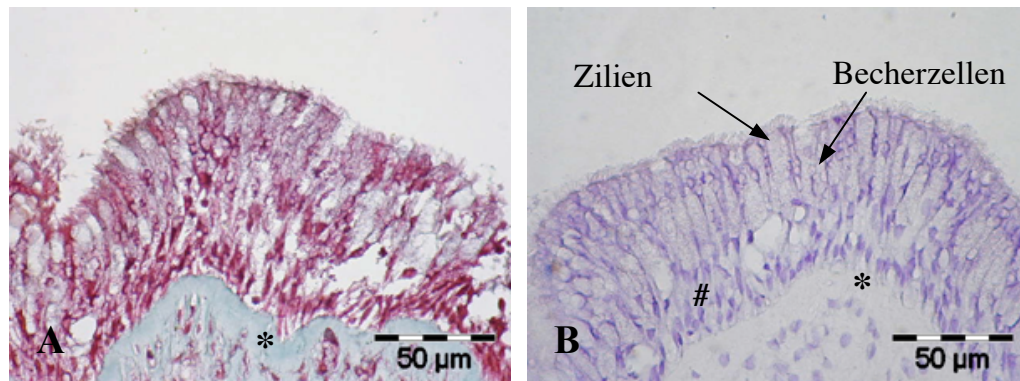


Abb. 2: Humanes respiratorisches Epithel; **A** Masson-Goldner Färbung; **B** HE-Färbung. (*) Basalmembran, (#) Basalzellen

Das respiratorische Epithel spielt eine wichtige Rolle bei der mukoziliären Clearance. Inhalierte Partikel werden in dem bis zu 10µm dicken Schleimfilm gebunden und von dem kehlkopfgerichteten Flimmerschlag der Zilien abtransportiert. Dabei erreicht der Mukus eine Fließgeschwindigkeit von bis zu 200µm pro Sekunde. Zusätzlich werden vom Gewebe antibakterielle und entzündungshemmende Substanzen freigesetzt, die zusammen als Schutzsystem fungieren [35].

1.4 Pathologie der Trachea und Ansätze zur Trachealrekonstruktion

Verschiedene Ursachen erfordern rekonstruktive Maßnahmen an der Trachea zur Erhaltung eines suffizienten Luftweges. Trachealdefekte können kongenitaler, traumatischer, entzündlicher oder tumoröser Natur sein. Dabei sind langstreckige Trachealdefekte mit einer Vielzahl von chirurgischen und postoperativen Problemen behaftet. Häufig treten im Rahmen dieser Eingriffe Infektionen und Schädigungen

auf, die zu Stenosen führen können. Sie sind unter anderem auf die exzessive Bildung von Granulationsgewebe bei fehlender Epithelialisierung zurückzuführen [36, 37].

Die End-zu-End-Anastomose nach Resektion ist die Methode der Wahl und kann normalerweise erfolgreich bei 50% aller Defekte bis zu einer Länge von 8cm durchgeführt werden [38]. Bei allen weiteren Fällen, in denen die primäre Anastomose nur erschwert durchgeführt werden kann, z.B. nach langstreckigen Resektionen, Inhalationsverbrennungen, Traumata, Tumorresektionen oder Langzeitintubationen [39], bieten sich Trachealprothesen an. Auch hier können jedoch Stenosen und Infektionen auftreten [40].

An eine Trachealprothese werden folgende Anforderungen gestellt: Sie muss ein bewegliches, druckstabiles Rohr sein, das mit einem funktionellen respiratorischen Epithel ausgekleidet ist [41]. Dabei ist eine vollständige Epithelialisierung die Hauptvoraussetzung, um einen zuverlässigen Infektionsschutz, eine Barriere gegen einwachsendes Bindegewebe sowie die mukoziliäre Clearance zu gewährleisten.

In den letzten 50 Jahren wurden sowohl klinische als auch experimentelle Versuche zur Trachealrekonstruktion mit Prothesen, Autografts, Homografts und Allografts durchgeführt [15]. Prothesen aus Dracon-Polyurethan Netzen, PTFE (Polytetrafluoroethylen), Polypropylen Netze, Gummi, Silikon und sogar Glasröhrchen [42] wurden verwendet, wobei der Einsatz einiger dieser Materialien risikobehaftet ist und mit Komplikationen wie Infektionen, Extrusionen und Stenosen einhergeht [38]. Autologe und alloplastische Gewebe verschiedenen Ursprunges wie z.B. Faszie, Haut, Knochen, Periost, Knorpel, Perichondrium, tracheale Allografts, Muskel, Ösophagus, Pericardium und Dura Mater [38, 43, 44, 45, 46] wurden verwendet. Aber auch hier traten Stenosen als Komplikationen auf.

1.5 Conchae nasales (Nasenmuscheln)

Die Nasenmuscheln befinden sich in den zwei Nasenhaupthöhlen, die ventral durch ein knorpeliges, und dorsal durch ein knöchernes Septum unterteilt sind. Je drei Nasenmuscheln liegen übereinander angeordnet vor und unterteilen die Nasenhöhlen in je drei Nasengänge; einen oberen, mittleren und unteren Nasengang [29]. Die oberste und kleinste Nasenmuschel wird als Concha nasalis suprema, die mittlere als Concha nasalis media und die größte untere Nasenmuschel als Concha nasalis inferior bezeichnet (Abb .3).

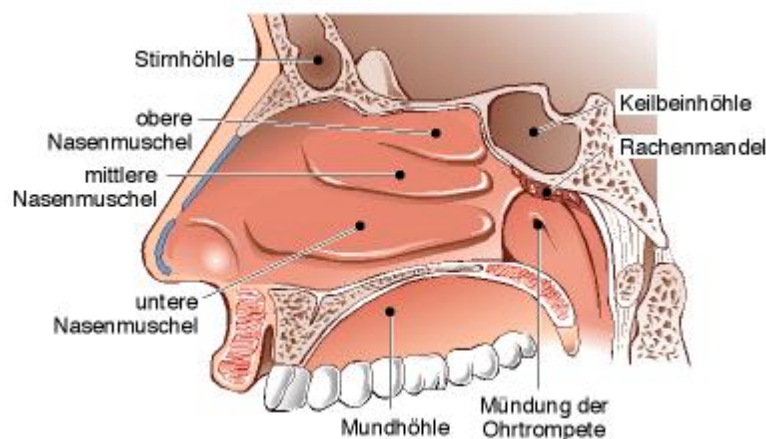


Abb. 3: Nasenhöhle im Sagittalschnitt [47]

Die Unterteilung der Nasenmuscheln dient zur Bildung eines laminaren Luftstroms, was zu einer Verringerung des Luftwiderstandes beim Atmen führt [29]. Die Nasenmuscheln bestehen aus einem schwellungsfähigen Gewebe, auf dem sich durch die Basalmembran vom Bindegewebe getrennt, das respiratorische Epithel befindet. Das respiratorische Epithel besteht aus dem charakteristischen mehrreihigen Zylinderepithel mit Flimmerbesatz, in das vereinzelte schleimproduzierende Becherzellen eingestreut sind [30]. Diese Form des Epithels kommt mit kleineren Abweichungen nahezu in den gesamten oberen Atemwegen und in Teilen der unteren Atemwege vor und wird daher respiratorisches Epithel genannt [29].

Eine Aufgabe der Conchae nasalis besteht in einer Vergrößerung der Oberfläche der Nasenhaupthöhle, wodurch eine effizientere Aufbereitung der Atemluft durch Reinigung, Befeuchtung und Erwärmung gegeben ist. Liegt eine übermäßige Vergrößerung der Nasenmuscheln (Muschelhyperplasie) vor, so kann eine Operation zur Verkleinerung der Nasenmuscheln (Konchotomie) durchgeführt werden. Diese Operation trägt zur Verbesserung der Nasenatmung bei [48].

1.6 Zellkultursysteme für respiratorische Zellen

Ein grundlegender Prozess in der regulären Funktion des respiratorischen Epithels ist neben der Proliferation die Sekretion von Schleim. Eine gesteigerte Schleimproduktion spielt bei der Pathogenese von vielen Erkrankungen der unteren Atemwege, wie z.B. Asthma [49] ebenfalls eine wichtige Rolle. Diese essenziellen Prozesse wurden in vielen verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Ansätzen untersucht. Diese Untersuchungen beschränkten sich jedoch größtenteils auf Monolayer-Zellkultursysteme [50]. Monolayer-Zellkultursysteme sind durch den Mangel an komplexen Zell-Zell Verbindungen und Zell-Matrix Interaktionen nur limitiert einsetzbar. Die extrazelluläre Matrix beeinflusst die Zellmorphologie und Funktion durch indirekte physikalische Kommunikation. Des Weiteren sind die Zellen *in vivo* mechanischen, elektrischen, strukturellen und chemischen Signalen ausgesetzt [51]. Daher wurden auch biphasische Organkulturen [52, 53] und Explantkulturen [17, 54] für Analysen von Interaktionen verschiedener Zelltypen untereinander sowie Proliferations- und Differenzierungsstudien verwendet.

Die Etablierung von organähnlichen Zellkulturen durch die Einführung der Air-Liquid-Interface Technik [55, 56] ermöglicht seit einiger Zeit reproduzierbare Untersuchungen zur Differenzierung und Regeneration von respiratorischem Epithel. Die Mehrheit der Autoren verwendete das System bisher für Untersuchungen am Bronchialepithel und zur Studie der Pathogenese von chronischen Atemwegserkrankungen sowie deren Therapie [57, 58, 59].

Eine Transduktion der Kulturen ist ebenso möglich, wie z.B. die Exposition gegenüber bakteriellen und viralen Produkten sowie Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus pharmakologischer Substanzen [60].

1.7 Genexpressionsmarker für respiratorische Epithelzellen

Neben der Kultivierung des respiratorischen Epithels *in vitro* wurden Genexpressionsanalysen von relevanten Proteinen durchgeführt, die die Zellen produzieren oder auch sezernieren können. So wurde die Genexpression von Muzinen in verschiedenen sekretorischen Zellen (Becherzellen, submuköse Drüsen etc.) bei asthmatischen Erkrankungen untersucht, wobei eine erhöhte Anzahl der sekretbildenden Zellen und damit einhergehend eine Änderung an gespeicherten und sezernierten Mucinen festgestellt wurde [49].

Der Nachweis von verschiedenen Zelltypen innerhalb der Epithelien wurde durch Glykohistochemie erbracht. Dabei wurden Lektine als spezifische Marker für die Lokalisation und Charakterisierung der Glykanprofile von Zellen und Geweben eingesetzt [24]. Seit längerem ist auch die Funktion von Zytokeratinen aus dem Zytoskelett als Zell- und Gewebemarker beschrieben [61].

Die Zytokeratin-Multigen-Familie besteht aus 20 verwandten Polypeptiden (CK1-20), die sich in 2 Subklassen untergliedern. Zytokeratine des Typ-I (CK9-20) und Typ-II (CK1-8) werden in verschiedenen Kombinationen, abhängig vom Epitheltyp und dem Differenzierungsgrad, exprimiert [27, 62]. Jeder respiratorische Epitheltyp zeigt charakteristische, differenzierungsabhängige Kombinationen von zwei oder mehreren Zytokeratinen, wobei Zytokeratine des Typ-I und des Typ-II in stöchiometrischen Mengen (also als Paare) vorkommen und eine Spezialisierung oder pathologische Veränderung widerspiegeln [26, 63].

Die Zytokeratine können somit zur Charakterisierung von verschiedenen Zellarten innerhalb des Epithels verwendet werden. Die Zytokeratine CK5 und CK14 werden zur immunhistochemischen Identifizierung und Quantifizierung von Basal- und Parabasalzellen verwendet [64] [65]. Dagegen fungiert CK18 als Marker bei der

Reifung des Epithels in der embryonalen Phase und CK13 ist ein Marker für Plattenepithelien [65, 66, 67].

1.8 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Eine der wichtigsten Instrumente zur Untersuchung der Genexpression ist die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction; PCR). Mittels dieses molekulargenetischen Verfahrens ist es möglich, selektiv bestimmte DNA-Abschnitte (Desoxyribonukleinsäure-Abschnitte) zu amplifizieren. Die Neusynthese von DNA-Sequenzen, die von zwei kurzen synthetischen Oligonukleotiden (Primer) eingerahmt werden, erfolgt mittels DNA-Polymerasen durch eine exponentielle Anreicherung. Ausgehend von geringen DNA Mengen können nach mehrmaliger Wiederholung des Vorgangs (20-40 Zyklen) die DNA-Abschnitte nachweisbar gemacht oder für andere gentechnische Zwecke benutzt werden.

1.8.1 Grundlagen der PCR

Die PCR gliedert sich in drei Hauptschritte, die hier beschrieben werden sollen: Im ersten Schritt wird bei ca. 90°C die als Doppelstrang vorliegende DNA denaturiert. Dabei werden die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basenpaaren aufgebrochen und die DNA liegt somit einzelsträngig vor. Im zweiten Schritt erfolgt das so genannte Primer Annealing. Bei Temperaturen zwischen 55°C und 72°C lagern sich die Oligonukleotide spezifisch an die komplementären Sequenzen der DNA-Einzelstränge an. Die thermostabile DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) verlängert in einem dritten Schritt, der Elongation genannt wird, bei ca. 72°C das 3' terminale Ende des Oligonukleotids und synthetisiert einen neuen, zum Template (DNA Abschnitt, der zur Vorlage dient) komplementären Strang aus Desoxyribonukleotiden [68]. Die genannten Temperaturbereiche sind jedoch von vielen Faktoren abhängig (z.B. Länge der Primer, GC Gehalt). Daher muss für jeden PCR Lauf die optimalen Bedingungen gefunden und in einem PCR-Programm am Gerät eingestellt werden (Abb. 4).

Die Polymerasen gehören zur Gruppe der Transferasen, die mit einzelsträngiger DNA als Matrize die dazu komplementäre DNA synthetisieren, indem sie Desoxyribonukleotidtriphosphate (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) unter Pyrophosphatabspaltung an die wachsende Kette anlagern. Sie sind auch an der Reparatur von DNA (z.B. UV-Schäden) beteiligt. Die Taq-Polymerase wird aus dem Bakterium *Thermophilus Aquaticus* isoliert. Von diesem Namen leitet sich die Bezeichnung "Taq"-Polymerase ab. *Thermophilus Aquaticus* bewohnt heiße Quellen und viele seiner Enzyme wie die DNA-Polymerase weisen eine hohe Toleranz gegenüber starker Hitze auf [69].

Die amplifizierten Produkte werden anschließend über eine gelelektrophoretische Auftrennung hinsichtlich ihrer Größe charakterisiert. Dazu werden in Abhängigkeit von der zu erwartenden Größe der DNA-Amplifikate 1-2%ige Agarose-Gele verwendet. Nach der Auftrennung erfolgt die Einfärbung des Gels mit einem fluoreszierenden Farbstoff (z.B. Ethidiumbromid), der spezifisch an DNA bindet. Die DNA wird dann unter UV-Licht sichtbar. Zur Größenbestimmung der PCR-Produkte werden geeignete DNA-Molekulargewichtsmarker im gleichen Gel mit aufgetrennt [68].

1.8.2 Genexpressionsanalysen auf RNA Ebene

Zum Nachweis von mRNA-Abschnitten muss die mRNA (Boten-Ribonukleinsäure) mittels einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase in eine DNA transkribiert werden. Die mRNA dient dabei der reversen Transkriptase (RT) als Vorlage zur Erzeugung einzelsträngiger cDNA (copy-DNA). Zum gezielten Umschreiben der mRNA wird ein Oligo-(dT)-Primer verwendet, der komplementär zu dem 3'PolyA-Ende der mRNA ist und als Startsequenz fungiert. Die erhaltene cDNA kann für Genexpressionsanalysen mittels PCR eingesetzt werden. Die mRNA ist Bestandteil der Gesamt-RNA. Ihr Anteil beträgt nur 5%, wobei der Anteil an tRNA (Transport-RNA) 15% und rRNA (ribosomale RNA) 80% an der Gesamt-RNA beträgt [70].

1.8.3 Quantitative und semiquantitative real-time RT-PCR

Bei vielen Fragestellungen ist eine Quantifizierung der DNA notwendig. Die Quantifizierung mittels der normalen PCR ist aber nur möglich, solange die PCR-Reaktion sich im linearen Bereich der Amplifikationseffizienz befindet. Dies ist bei jeder PCR-Reaktion verschieden und kann nur sehr schwer überprüft werden, z.B. indem nach jedem PCR-Zyklus ein Aliquot aus der Reaktion entfernt und auf ein Gel aufgetragen wird. Diese Überprüfung entfällt, wenn die gebildete DNA-Menge während des PCR-Laufs im Reaktionsgefäß gemessen werden könnte [71]. Dies ist mit Hilfe der real-time RT-PCR möglich. Die real-time RT-PCR ermöglicht es im Gegensatz zur Standard PCR, die eine Endpunktbestimmung darstellt, die PCR Reaktion zu allen Zeitpunkten zu verfolgen.

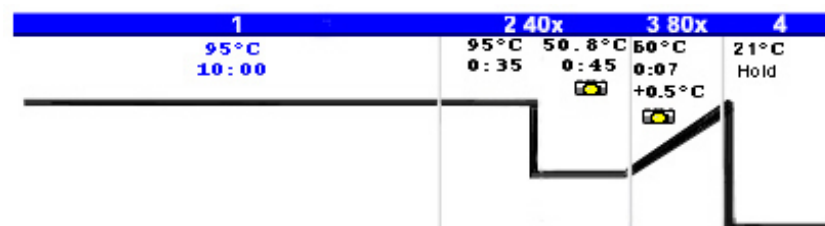


Abb. 4: Programmschema eines PCR Laufs (i-Cyklus, BioRad)

Das zugrunde liegende Prinzip ist die kontinuierliche Messung eines Fluoreszenzsignals, das während der PCR proportional mit der Menge des Amplifikationsprodukts ansteigt.

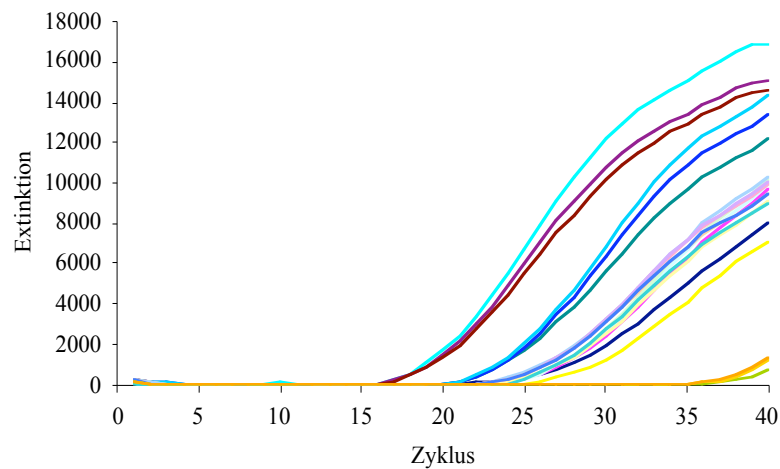


Abb. 5: Beispiel für aufgenommene real-time PCR Daten

Im weiteren Verlauf sollen zwei Prinzipien der quantitativen real-time RT-PCR erklärt werden: das TaqMan™-Prinzip und der Einsatz von SYBR-Green I.

Zusätzlich zu den beiden Primern, die in jeder PCR vorhanden sind, kann eine Gensonde zugesetzt werden, die spezifisch an eine Gensequenz zwischen den beiden Primern bindet und mit einem Fluoreszenzfarbstoff und einem Quencher (Verstärker) markiert ist (TaqMan™-Prinzip) [72]. Sind diese beiden Moleküle an das Oligonukleotid gebunden, erhält man keine Fluoreszenz, da diese durch das "Quenching-Molekül" abgefangen wird. Zum Zeitpunkt des PCR-Primer Annealings bindet auch die TaqMan™ Probe an die Ziel-DNA. Die Polymerase synthetisiert nun den zweiten Strang und kommt zur gebundenen TaqMan™ Probe. Da die Polymerase eine 5' Exonukleaseaktivität besitzt, löst sie die TaqMan™ Probe nicht von der Ziel-DNA ab, sondern baut die Probe ab. Das "Quenching-Molekül" wird vom Fluoreszenzfarbstoff getrennt, dieser emittiert somit Fluoreszenz definierter Wellenlänge, deren Intensität in der Summe direkt proportional der Zahl der neu gebildeten DNA-Stränge ist (Quantifizierung). Der Zeitpunkt der Messung im Zyklus ist nicht kritisch, da eine einmal abgebaute TaqMan™ Probe permanent fluoresziert. Innerhalb der PCR-Kurve kann dann ein geeigneter Punkt für die Quantifizierung gewählt werden. Die TaqMan™ Sonden reagieren jedoch relativ sensibel auf einzelne Fehlbasen. Das ist bei der Analyse von beispielsweise virologischen Proben von Bedeutung, bei denen eine solche genetische Varianz zu

erwarten ist nämlich das Fehlen des Signals trotz erfolgreicher Amplifikation. Somit kann die Sensitivität der Methode auch ein Nachteil sein [73]. Neben dem TaqMan™ -System sind noch andere Sondensysteme kommerziell erhältlich.

Eine weitere Möglichkeit für die Quantifizierung besteht in der Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen, die an die DNA binden können, wie zum Beispiel der Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green I. Dieser Fluorophor hat die Eigenschaft, unspezifisch in die Doppelstrang-DNA zu interkalieren (Abb .6). Dies führt mit fortschreitender PCR-Reaktion zu einem Anstieg des Fluoreszenzsignals (Abb .5) [72].

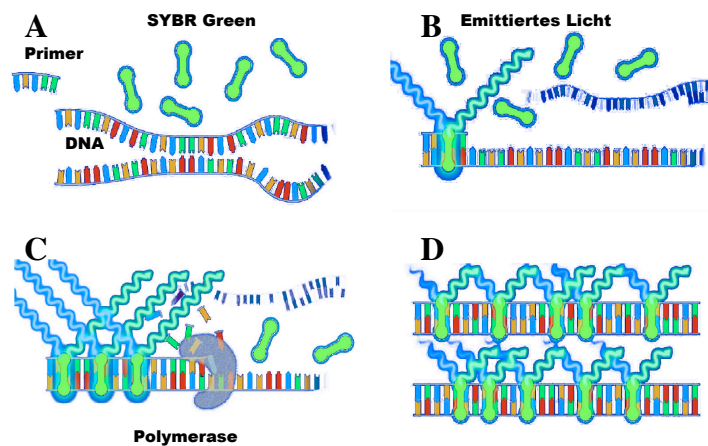


Abb. 6: Schematische Darstellung eines PCR Zyklus bei Verwendung von SYBR Green. **A** Denaturierung; **B** Annealing; **C** Elongation; **D** PCR Produkt [73] (modifiziert)

Bei der Verwendung von SYBR-Green I fehlt allerdings die Spezifität hinsichtlich des zu untersuchenden Templates, da auch Primer-Dimere oder Nebenprodukte, die sich während der Reaktion bilden, einen Fluoreszenzanstieg verursachen. Dieser ist zunächst nicht von dem Signal des spezifischen Produkts zu unterscheiden. Eine Differenzierung zwischen spezifischem Produkt und Primer-Dimeren oder Nebenprodukten kann erst nach Abschluss der PCR-Reaktion mittels einer Schmelzkurvenanalyse erfolgen (Abb. 7). Bei dieser werden die PCR-Produkte kontinuierlich über einen bestimmten Temperaturbereich aufgeheizt, bis sie ihrem

Schmelzpunkt entsprechend nur noch als Einzelstrang vorliegen. Die damit verbundene Fluoreszenzabnahme wird aufgezeichnet. Kleinere Fragmente wie z.B. Primer-Dimere weisen einen niedrigeren Schmelzpunkt auf als die spezifischen PCR-Produkte [72].

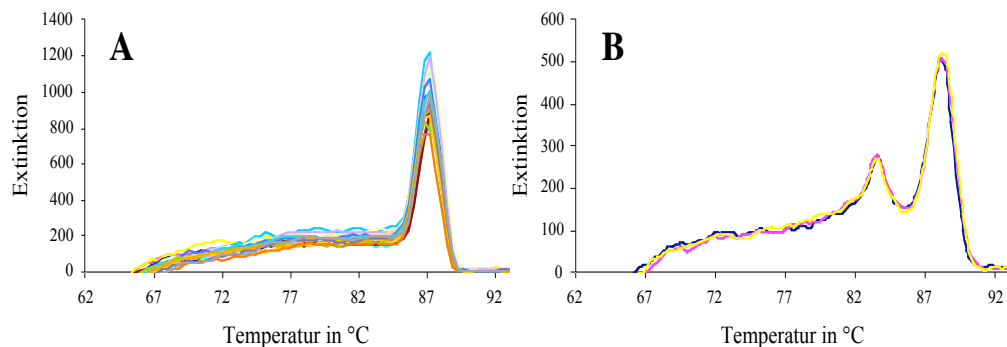


Abb. 7: Darstellung einer Schmelzkurvenanalyse; **A** ein Produkt; **B** zwei Produkte

Als Referenzmaterial für die Bestimmung der absoluten Menge der Genkopien können Plasmide dienen, die ein spezifisches Fragment der gesuchten Gensequenz enthalten, das durch die jeweiligen Primer und Sonden nachgewiesen werden kann. Plasmide können im Gegensatz zu genomischer DNA einfach in reiner Form dargestellt und danach mittels UV-Spektroskopie quantifiziert werden.

Eine semiquantitative Analyse der Genexpression reicht dann aus, wenn eine Genregulation nachgewiesen werden soll und absolute Werte nicht im primären Interesse liegen. Dabei wird die gesuchte DNA-Menge zu der konstanten DNA-Menge, die durch ein nicht reguliertes Haushaltsgen exprimiert wird, ins Verhältnis gesetzt. Hierbei ist jedoch darauf zu achten, dass die Effektivität der jeweiligen Primer annähernd gleich ist.

Ein weiterer großer Vorteil der real-time PCR-Methode ist, dass die Reaktionsgefäße nach der PCR-Reaktion nicht mehr geöffnet werden müssen, da die Messung und Quantifizierung nach Beendigung der PCR-Reaktion abgeschlossen ist. Es entfällt

somit die teilweise aufwendige Gelaufentrennung der PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese, weiterhin ist grundlegend, dass das Risiko einer Kontamination durch wiederholtes Öffnen der Reaktionsgefäße entfällt [74].

1.9 Durchflußzytometrie

Das Prinzip der Durchflußzytometrie beruht auf einer Messung von physikalischen Eigenschaften der Zellen. Die Zellen passieren einen Laserstrahl und einzelne Detektoren messen anschließend die Lichtstreuung und das Fluoreszenzlicht. Man unterscheidet dabei die Messung der Streuung in Vorwärtsrichtung (Aufwärtstreulicht) und Streuung im rechten Winkel zum einfallenden Lichtstrahl (Orthogonalstreulicht). Die Lichtstreuung einer Zelle ist abhängig von ihrer Größe und der Oberflächen- und Zytoplasmabeschaffenheit. Dabei gibt das Vorwärtstreulicht (Forward-Scatter; FSC) Auskunft über die Größe einer Zelle, während das Orthogonalstreulicht (Side-Scatter; SSC) etwas über die Granularität der Zelle aussagt [75].

Zur Untersuchung verschiedener Zellpopulationen können Zellen mit monoklonalen Antikörpern, die spezifisch gegen bestimmte Oberflächenantigene gerichtet sind, markiert werden. Durch Fluoreszenzfarbstoffe, die an die Antikörper gekoppelt sind, werden diese durch Anregung der Fluoreszenz sichtbar gemacht. Die Durchflußzytometrie ermöglicht neben der Analyse auch die Separation von Zellfraktionen mittels Fluoreszenzfarbstoffen (FACS Fluorescence Activated Cell Sorting) [76].

Aus den zahlreichen in der Literatur beschriebenen Fluoreszenzfarbstoffen haben sich für die Antikörpermarkierung im Routineeinsatz bei den heute in der Klinik üblichen Argonlasergeräten folgende bewährt:

- Fluoreszein (FITC, DFTF)
- R-Phycoerythrin (PE), ein Makromolekül aus Algen
- Peridiniumchlorophyll-Protein (PerCP), Überträgerprotein aus der pflanzlichen Photosynthesekette

- Tandemkonjugate wie PE-Cy5 oder PE-Texas-Rot zur Verstärkung des Signals
- Acridinorange (AO, Vitalfarbstoff färbt DNA grün und RNA rot), Thiazolorange (TO, Vitalfarbstoff färbt RNA grün), Propidiumjodid (PI, Totfarbstoff färbt DNA orange-rot), Ethidiumbromid (EB, ähnlich wie PI), Styryl 8 (LDS751, Vitalfarbstoff, färbt DNA rot), 7-AAD (7-AminoactinomycinD)
- Rhodamin123 (Mitochondrienmembran) zur Membranpotentialfärbung [77]

1.9.1 Polyklonale Antikörper

Immunisiert man ein Tier oder infiziert sich der Mensch mit einer körperfremden Substanz (ausreichender Molekülgröße), so wird vom Immunsystem eine Antikörperantwort in Gang gesetzt. Da ein Antigen meist viele Epitope, sprich antigene Determinanten besitzt, werden unterschiedliche Antikörper gebildet (polyklonale Immunantwort), wobei die Antikörper von jeweils anderen B-Lymphozyten gebildet werden. Wiederholte Impfungen des Tieres führen zu einer schnelleren Antikörperproduktion und einer höheren Konzentration (Titer). Das Serum dieses Tieres enthält bei einer wiederholten Immunisierung Antikörper verschiedenster Epitopspezifität, welche unterschiedlichen Immunglobulin-Subklassen angehört. Polyklonale Antikörper haben agglutinierende Eigenschaften im Gegensatz zu monoklonalen. Sie enthalten oft unbekannte und unerwünschte Spezifitäten, da das Serum auch Antikörper gegen nicht bekannte Antigene enthält (z.B. Infektionserreger). Abhilfe schaffen hier die Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie oder eine Präabsorption, die unerwünschte Kreuzreaktionen (z.B. Immunglobuline verschiedener Spezies) eliminiert [78].

1.9.2 Monoklonare Antikörper

Isoliert man solche nur begrenzt kultivierbaren antikörperproduzierenden B-Lymphozyten z.B. aus der Milz einer immunisierten Maus und fusioniert diese mit leicht in Kultur wachsenden Tumorzellen, so entstehen einerseits Hybridomazellen, welche unsterblich sind und andererseits solche, die den gewünschten Antikörper

produzieren. Erst durch wiederholte Vereinzelung per Verdünnung (limiting dilution) oder „cell sorting“ (FACS = fluorescence activated cell sorting) entstehen Kulturen, die aus einer Zelle hervorgegangen sind (Klone). Liegt die gewünschte Spezifität vor, so werden diese Klone in Massenkulturen überführt, deren Überstände geerntet und teilweise auch gereinigt [78].

1.10 Aufgabenstellung und Ziel der Arbeit

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war:

- I. Die Isolierung und Kultivierung von humanen respiratorischen Epithelzellen
- II. Die Charakterisierung der humanen respiratorischen Epithelzellen unter proliferativen und differenzierenden Bedingungen
- III. Die Separation von möglichen Vorläuferzellen aus dem humanen respiratorischen Epithel
- IV. Die Entwicklung von Co-Kulturen aus humanem Knorpel bzw. Knorpelzellen und respiratorischen Epithelzellen *in vitro*

mit dem Ziel, grundlegende Kenntnisse über die humanen respiratorischen Epithelzellen in Hinblick auf eine neue Möglichkeit zur Herstellung eines bioartifiziellen Trachealersatzes zu erhalten.

2 Material

2.1 Reagenzien und Lösungen

2.1.1 Zellkultur

Airway Epithelial Cell Growth Medium	PromoCell
Dispase II 2,4U/ml	Roche Diagnostics
Essigsäure 1% (v/v) in PBS	J.T. Baker
Fetal-Bovine-Serum	Biochrom AG
Hanks Salzlösung mit Phenolrot	Biochrom AG
Hyaluronidase 1000U/ml	Sigma-Aldrich
Kollagen A 1mg/ml	Biochrom AG
Kollagenase CLS II 10.000U/ml	Biochrom AG
Kollagenase P 30U/ml	Boeringer Mannheim
Penicillin/Streptomycin 10000U/ml/10000µg/ml	Biochrom AG
Phosphat-Buffered-Saline ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$	Biochrom AG
Percoll separating solution 1,077g/ml	Biochrom AG
RPMI 1640 Medium (mit Hepes; mit L-Glutamin)	Biochrom AG
Tryphanblau 0,4%	Sigma
Trypsin 0,5% / EDTA 0,2%	Biochrom AG

2.1.2 Molekularbiologie

Brom-Chlor-Propan	Sigma
dATP, dGTP, dCTP, dTTP 100mM	Invitrogen
DEPC- H_2O	Sigma
Diethylpyrocarbonat	Sigma
DTT 0,1M	Invitrogen
Ethanol 70% in DEPC- H_2O	J.T. Baker
5x First Strand Buffer	Invitrogen
Isopropanol	J.T. Baker
Oligo (dt)12-18 Primer 0,5µg/µl	Invitrogen

Material

Rnasin RNase Inhibitor 40U	Promega
SuperScript Rnase H- RT 200U/μl	Invitrogen
Tri Reagent LS	Sigma
Tris-EDTA Puffer	Sigma

2.1.3 Histologie, Immunhistochemie, Durchflußzytometrie und Mikroskopie

Aceton	J.T. Baker
Alcianblau 8GX	Roth
3-Amino-9-Ethyl-Carbazol (AEC)	Dako
Antikörper-Verdünnungs-Puffer	Dako
Aquatex	Merck
Bisbenzimid 10μg/ml	Sigma
DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol)	Sigma
Eisenhämatoxylin nach Weigert	Merck
Eosin	Merck
Essigsäure 99%	J.T. Baker
Ethanol 100%	J.T. Baker
EnVision™+System, Peroxidase (AEC, Mouse)	DAKO
Formaldehyd-Lösung 4% gepuffert	Herbeta-Arzneimittel
Glutaraldehyd (25% v/v in PBS)	Roth
Hämatoxylin nach Mayer	Sigma
Horse-Radish-Peroxidase (HRP)	DAKO
Kanadabalsam	Merck
Kernechtrot-Aluminiumsulfat	Merck
Lichtgrün	Merck
Methanol	J.T. Baker
Monoklonaler Antikörper 34βE12 (Mouse, Anti-Human)	DAKO
Monoklonaler Antikörper CD3-Biotin (Mouse, Anti-Human)	DRFZ
Monoklonaler Antikörper CD49f (Mouse, Anti-Human)	ACRIS GmbH

Monoklonaler Antikörper CD49f-PE (Mouse, Anti-Human)	ACRIS GmbH
Monoklonaler Antikörper CD104 (Mouse, Anti-Human)	ACRIS GmbH
Monoklonaler Antikörper CD104-PE (Mouse, Anti-Human)	ACRIS GmbH
Monoklonaler Antikörper CD44v6 (Mouse, Anti-Human)	Bender Medsystems
Orange G	Merck
Peroxidase-Inhibitor	DAKO
Phosphormolibdänsäure	Merck
Ponceau de Xylidine	Merck
PBS/BSA 0,5%	DRFZ
Proteinblock, serumfrei mit Casein 0,25%	DAKO
Säurefuchsin	Merck
Streptavidin-PE	DRFZ
Xylol	J.T. Backer

2.2 Geräte

2.2.1 Zellkultur

Cellagen Discs CD-6	ICN Biomedicals
CO ₂ -Begasungsbrutschrank Hera Cell	Heraeus
Gefrierschrank –20°C	Liebherr
Gefrierschrank –80°C	Gesell. für Labortechnik
Kanülen (20G) steril	Braun
Magnetrührer, Variomag	Biosystem
Mikroskop CK 40 mit Digitalkamera C-2020Z	Olympus
Neubauer Hämozytometer (2,5x10 ⁻³ mm ²)	Paul Marienfeld
Petrischalen (d=8,5cm)	Nunc Brand Products
Pipettenspitzen steril	Eppendorf
Pipettierhilfe Akku-Jet	Brand
Röhrchen 15ml/50ml	Becton Dickinson

Material

Serologische Pipetten	Becton Dickinson
Skalpelle steril	Bard Parker™
Spinner-Flaschen 50ml	Wheaton
Spritzen steril	Braun
Sicherheitswerkbank Hera Safe Klasse 2 Typ H	Heraeus
Sterilfilter 0,2µm	Schleicher & Schuell
Wasserbad Typ 1003	Gesell. für Labortechnik
6-Well Kulturplatten steril	Falcon
8-Well Chamber Slides (1,25cm ² /Kammer)	Lab-Teck
Zellkulturflaschen T25/T75/T175	Nunc Brand Products
Zell-Schaber	Corning Inc.
Zellsiebe 100µm	Becton Dickinson
Zentrifuge 5804 mit Ausschwingrotor	Eppendorf
Zentrifugenröhrchen (15ml, 50ml), steril	Nunc Brand Products

2.2.2 Molekularbiologie

Photometer GeneQuant pro	Biochrom AG
Plexi Cooler	Biozym
Pipetten	Rainin
Reaktions Caps	Applied Biosystems
Reaktionsgefäße 1,5ml und 2ml	Eppendorf
Reaktionsgefäße 0,2ml	Applied Biosystems
Sero Cooler Easy Freezer	Biozym
Ständer	Eppendorff
Thermocycler PTC 100	MJ Research inc.
Thermomixer 5436	Eppendorf
Vortex-Genie	Merck
Zentrifuge Biofuge Fresco	Heraeus

2.2.3 Histologie, Immunhistochemie, Durchflußzytometrie und Mikroskopie

Critical Point Dryer	Balzers Union
DAKO-Pen	DAKO
Deckgläschen	Menzel Gläser
Faltenfilter	Schleicher & Schuell
Fluoreszenzdurchflußzytometer FACSCalibur	BD Bioscience
Zellsortiermaschine (Cell Sorter) MoFlo	Dako Cytomation Inc.
Kryostat CM1900	Leica
Rasterelektronenmikroskop DSM 950	Zeiss
Mikroskop CX41 mit Digitalkamera C-2020Z	Olympus
Objektträger	Menzel Gläser
Silicagel-Kugeln	Roth
Sputtergerät SCD 040	Balzers Union
Tissue Tek Einbettmedium	Sakura Finetek
Tissue Teck Einbettsschalen	Miles
Wärmeschrank Function Line 37°C	Heraeus

2.3 Nährmedien für die Zellkultur

AECGM; serumfrei

Adrenalin 0,5µg/ml	Insulin 5µg/ml
Bovine Pituitary Extract 0,4%	Transferrin 10µg/ml
Epidermal Growth Factor 0,5ng/ml	Triiodthyronin 6,7ng/ml
Hydrokortison 0,5µg/ml	Vitamin A 0,1ng/ml
P/S 1%	

Material

RPMI 1640 Kulturmedium

P/S 1%	NaCl 5,5g/l
FBS 10%	NaHCO ₃ 2g/l
HEPES 25mM	Phenolrot 5mg/l
N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin 0,532g/l	

Basismedium für die Chondrozytendifferenzierung

DMEM (high glucose)	HEPES 25mM
P/S 1%	

Differenzierungsmedium für Chondrozyten

Basismedium	Dexamethason 0,1µM
ITS 1%	NaHCO ₃ 2g/l
Natriumpyruvat 1mM	Ascorbat 0,17mM
TGF-β1 10ng/ml	L-Prolin 0,35mM

3 Methoden

3.1 Isolierung und Kultivierung von humanen respiratorischen Epithelzellen

Bei einer Konchotomie wird zur Nasenhöhlensanierung die untere Nasenmuschel entfernt. Das bei der oben genannten Operation anfallende Gewebe kann für Forschungszwecke zur Verfügung gestellt werden (dem Ethikantrag Versch/Si 253 wurde am 22.8.2002 zugestimmt). Aus den Nasenmuscheln wurde das respiratorische Epithel mit Hilfe eines enzymatischen Verdaus isoliert [79].

Der Enzymcocktail für den Verdau beinhaltet Dispase Grade II in einer Konzentration von 2,4U/ml gelöst in PBS. Die Nasenmuscheln wurden in dieser Enzymlösung bei 4°C über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag schabte man vorsichtig mittels eines Skalpell das respiratorische Epithel von dem darunter liegenden Bindegewebe der Nasenmuschel ab. Die so gewonnenen Epithelzellen wurden in ein mit Medium gefülltes Falconröhrchen überführt und bei 600g abzentrifugiert. Nach einmaligem Waschen mit Hanks-Salzlösung wurde die Zellzahl wie in Kapitel 3.5. bestimmt. 12.000 Zellen/cm² wurden anschließend in eine mit Kollagen A beschichtete Zellkulturflasche ausgesät.

Für die Kollagenbeschichtung der Zellkulturflaschen wurden pro 10cm² Kulturoberfläche 1ml einer 1:1 verdünnten Lösung Kollagen A in PBS in das Kulturgefäß gegeben und 30min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung abgesaugt und das Kulturgefäß sofort verwendet oder ggf. mit PBS-Puffer überschichtet und bei 4°C für maximal sieben Tage gelagert.

Die Kultivierung der Epithelzellen erfolgte im Brutschrank bei 37°C, 5%igen CO₂ Gehalt und 96%iger Luftfeuchtigkeit in Airway Epithel Cell Growth Medium (AECGM), wobei das Nährmedium alle zwei bis drei Tage gewechselt werden musste. Nach Erreichen einer 70%igen Konfluenz wurden die Zellen passagiert und wieder ausgesät.

3.2 Isolierung und Kultivierung von humanen Chondrozyten aus Nasensepten

Im Gegensatz zu der bereits erwähnten Koncheotomie und Nasenhöhlensanierung wird bei der Nasenseptum-Plastik Nasenseptumknorpel entfernt. Die im weiteren Verlauf der Operation nicht mehr benötigten knorpeligen Teile des Septums wurden zur Gewinnung von Chondrozyten zur Verfügung gestellt (dem Ethikantrag Versch/Si 254 wurde am 22.8.02 zugestimmt).

Zunächst wurde der knorpelige Anteil des Nasenseptums mit einem Skalpell vom knöchernen Teil abgetrennt und in ca. 1mm² große Stücke zerkleinert. Die 3x mit 70%igem Alkohol gewaschenen Knorpelstücke wurden in einem Enzymcocktail bestehend aus Kollagenase P (30U/ml), Kollagenase CLS II (10.000U/ml) und Hyaluronidase (1000U/ml) in eine Spinnerflasche überführt. Der enzymatische Verdau erfolgte auf einem Magnetrührer über Nacht bei 37°C, 5%CO₂ Gehalt und 96%iger Luftfeuchtigkeit. Am nächsten Morgen wurde der Verdau durch ein 100µm dichtes Zellsieb gegossen, um unverdautes Material und größere Zellklumpen zu entfernen. Die aufgefangene Zellsuspension wurde mit Hanks Salzlösung auf ein Volumen von insgesamt 50ml aufgefüllt, bei 600g abzentrifugiert und einmal gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren bei 600g wurde das entstandene Zellpellet in Kulturmedium aufgenommen. Die Zellen wurden wie unter 3.5 beschrieben gezählt und in Zellkulturflaschen in einer Dichte von 8000 Zellen/cm² ausgesät. Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank bei 37°C, 5%igen CO₂ Gehalt und 96%iger Luftfeuchtigkeit in supplementiertem RPMI 1640 Medium, wobei das Nährmedium alle zwei bis drei Tage gewechselt wurde.

3.3 Isolierung und Kultivierung von humanen Chondrozyten aus dem Kniegelenk

Humaner Gelenkknorpel wird von humanen Femurkondylen des Kniegelenks post mortem gewonnen (Für die Ethikkommission der Charité-Universitätsmedizin Berlin bestehen keine ethischen und rechtlichen Bedenken. Antrag am 28.2.02 genehmigt). Dazu wurden die mit Knorpel überzogenen Kondylen mit 70% Ethanol abgewischt und der Knorpel

mittels Skalpell abgelöst, ohne den subchondralen Knochen zu verletzen. Die abgelösten Knorpelstücke wurden sofort in RPMI-Nährmedium gegeben und darin bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt. Anschließend wurde das Knorpelgewebe zunächst drei Mal mit 70%igem Alkohol gewaschen und 1x in Hanks-Salzlösung gespült und entweder in 0,5x0,5cm² große Stücke geschnitten und im Nährmedium bei 4°C gelagert oder für die Chondrozytengewinnung wie im Punkt 3.2 beschrieben verarbeitet.

3.4 Isolierung und Kultivierung von humanen Fibroblasten

Die Submukosa der Nasenmuschel wurde mit dem Skalpell zerkleinert und in einem Enzymcocktail bestehend aus Kollagenase P (30U/ml) und Kollagenase CLS II (10.000 U/ml) verdaut, die Fibroblasten geerntet, gezählt, mit einer Zelldichte von 4000 Zellen/cm² ausgesät und im Brutschrank mit RPMI 1640 Medium kultiviert. Im Unterschied zu der Chondrozytenkultivierung wurde das beim 48-stündigen Mediumwechsel abgenommene Medium nicht verworfen, sondern als Medium für Co-Kulturversuche aufbewahrt. Dieses Medium bezeichnet man als konditioniertes Medium.

3.5 Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung

Die Zellzahl wurde mit der Trypanblau-Exklusions-Methode bestimmt. 20µl der Zellsuspension wurden in einem Reaktionsgefäß mit 20µl Trypanblau verdünnt und gleichzeitig gefärbt. Die gefärbten Zellen wurden mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt und die Anzahl der Zellen in der nach folgender Formel bestimmt: Mittelwert der in 4x16 Feldern gezählten Zellen (X) multipliziert mit dem Gesamtvolumen der Zellsuspension (Y), der Verdünnung mit Trypanblau (Faktor 2) und der durch die technischen Vorgaben der Neubauer-Zählkammer bedingten Konstanten (10⁴).

$$\text{Zellzahl} = X \times Y \times 2 \times 10^4$$

Die Vitalitätsbestimmung erfolgt ebenfalls durch die Anfärbung der Zellen mit Trypanblau. Vitale Zellen erscheinen hell leuchtend, während tote Zellen dunkelblau angefärbt sind. Nach Division der Lebendzellzahl durch die Gesamtzellzahl und Multiplikation mit dem Faktor 100 erhält man den prozentualen Anteil an lebenden Zellen in der Zellsuspension. Primärzellisolationen, die eine Vitalität von 50% unterschritten, wurden verworfen.

Um eine Verwechslung von Erythrozyten mit respiratorischen Epithelzellen beim Zählen zu verhindern, wurde die Methode der Zellzahlbestimmung für diese Zellart modifiziert. 20µl der Zellsuspension wurden zunächst mit 20µl Essigsäure (1% v/v in PBS) gemischt. Die Essigsäure bewirkt eine Schädigung der Zellmembran der Erythrozyten, so dass diese durch die Zugabe von Trypanblau dunkelblau angefärbt wurden. Zur Berechnung mußte das Volumen der zugegebenen Essigsäure berücksichtigt werden, indem der Verdünnungsfaktor auf vier erhöht wurde.

3.6 Passagieren von Zellen aus Monolayerkulturen

Nach Absaugen des Nährmediums und einem einmaligen Waschen der Zellen mit PBS pipettierte man je nach Flaschengröße 2 bzw. 5ml Trypsin/EDTA-Lösung in die Kulturflasche und inkubierte das Zellgemisch bei 37°C im Brutschrank ca. 5min bis zum Ablösen der Zellen. Die Enzymaktivität des Trypsins wurde anschließend mit serumhaltigem RPMI -Medium abgestoppt und die Zellsuspension 5min bei 600g zentrifugiert. Das so erhaltene Zellpellet wurde in dem entsprechenden Kulturmedium resuspendiert, die Zellen gezählt und erneut in der entsprechenden Zelldichte in Kulturflaschen ausgesät.

3.7 Differenzierungskulturen von humanen respiratorischen Epithelzellen in Zellkulturflaschen

Humane respiratorische Epithelzellen aus der Passage 1 wurden in einer Zelldichte von 12.000 Zellen/cm² in 25cm² Kulturflaschen ausgesät und zwölf Tage über den Zeitpunkt der Konfluenz hinweg kultiviert. Zum Zeitpunkt einer 70%igen und einer 100%igen

Konfluenz (d0), sowie nach vier (d4), acht (d8) und zwölf Tagen (d12) nach Konfluenz wurden die Epithelzellen aus je zwei Flaschen geerntet und deren RNA isoliert. Diese Versuchsreihe wurde mit sechs Patientengeweben durchgeführt.

3.8 Air-Liquid-Interface Kulturen von humanen respiratorischen Epithelzellen

Das Prinzip der Zellkultivierung im Air-Liquid-Interface wurde im Rahmen dieser Dissertation in der Arbeitsgruppe etabliert.

Humane respiratorische Epithelzellen wurden wie unter 3.6 beschrieben passagiert und in einer Zelldichte von 20.000 Zellen/cm² auf spezielle Kollagenmembranen (Cellagen Discs; Abb .8) gesät.

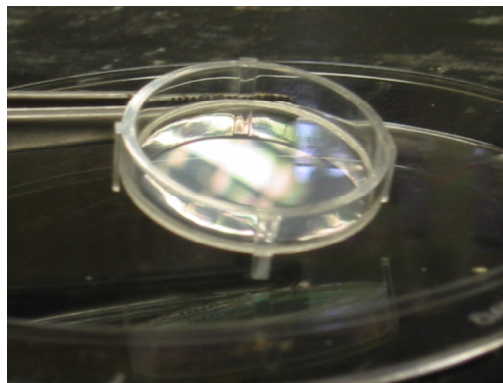


Abb. 8: Kollagenmembraneinsatz für die Air-Liquid Interface Kultur

Diese Kollagenmembranen mußten vor dem Einsatz in 6-well Platten platziert und mit 7ml AECG-Medium für 30min bei 37°C inkubiert werden, bevor sie mit den hREC besiedelt wurden. Die mit Epithelzellen beschichtete Membran wurde dann bis zur Konfluenz bei 37°C kultiviert. Jetzt wurde das Medium oberhalb der Zellen entfernt, um ein Luftmilieu zu simulieren, das so genannte Air-Liquid-Interface. Die Gesamtkulturdauer nach dem Erreichen der Konfluenz betrug zwölf Tage, wobei das Medium unterhalb der zellhaltigen

Membran jeden zweiten Tag gewechselt werden musste. Zum Zeitpunkt einer 100%igen Konfluenz (d0) sowie nach vier (d4), acht (d8) und zwölf Tagen (d12) nach Konfluenz wurden die Epithelzellen von je zwei Kollagenmembranen geerntet und anschließend die RNA isoliert. Auch bei diesem Versuch wurden Epithelzellen von sechs Patienten verwendet.

3.9 Hochdichte-Pelletkulturen aus humanen Chondrozyten

Für die Hochdichte-Pelletkulturen wurden zunächst Chondrozyten von humanem Nasenseptumknorpel verschiedener Patienten wie beschrieben isoliert, kultiviert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Für die Herstellung eines Zell-Pools wurden die Chondrozyten aller Patienten gleichzeitig aufgetaut und die Zellsuspensionen vereinigt. Dieses Zellgemisch wurde in Zellkulturflaschen ausgesät und kultiviert. Kurz vor der Konfluenz wurden die Zellen wie in 3.6 beschrieben trypsinisiert und anschließend gezählt. Je $1,5 \times 10^6$ Zellen wurden in 15ml Rörchen überführt und diese für 5min bei 324g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit 1ml Basismedium gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren für 5min bei 324g, wurden die Pellets in 0,5ml TGF β -1 supplementiertem Differenzierungsmedium resuspendiert, erneut zentrifugiert und anschließend im Brutschrank bei 37°C, 5% CO $_2$ Atmosphäre kultiviert. Eine Kontrollgruppe wurde ebenfalls mit Differenzierungsmedium, aber ohne den Zusatz von TGF β -1, kultiviert. Der Medienwechsel erfolgt alle 48h.

3.10 Gesamt-RNA Isolation

3.10.1 Gesamt-RNA Isolation aus humanen respiratoischen Epithelzellen in Monolayerkulturen

Für die Isolation der Gesamt-RNA wurde das Medium über den humanen respiratorischen Epithelzellen abgesaugt, der Zellrasen wurde mit 1ml Tri-Reagent LS pro 25cm 2 Kulturoberfläche versetzt und für 1min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde mit Hilfe eines Zellschabers die Epithelzellen vom Flaschenboden gelöst [80, 81]. Das entstandene Zelllysat wurde in 2ml Reaktionsgefäße überführt und bei -80°C gelagert.

Waren alle Zelllysate eines Patienten zu den unter 3.7 beschriebenen Zeitpunkten gesammelt, begann erst dann die eigentliche Gesamt-RNA-Isolation. Die gefrorenen Zelllysate wurden aufgetaut, 5min bei Raumtemperatur inkubiert und mit 133µl 1-Bromo-3-chlorpropan (BCP) pro 1ml Zelllysat versetzt, 20sec geschüttelt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend zentrifugierte man die Proben 45min bei 4°C und 12.000g. Das Zentrifugat wies dann bereits eine Phasentrennung auf.

Die obere RNA-haltige Phase wurde abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und auf Eis weiterbearbeitet. 70% Isopropanol wurde entsprechend dem RNA-haltigen Probenvolumen 1:1 zugegeben und bei -20°C für 30min inkubiert. In dieser Phase wurde die RNA gefällt. Die RNA wurde im Anschluss durch Zentrifugation bei 4°C und 12.000g als Pellet gewonnen. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (4°C; 12.000g). Das Ethanol wurde nach der Zentrifugation verworfen und durch zusätzliche Lufttrocknung vollständig entfernt. Das RNA Pellet wurde nun in 20µl DEPC H₂O (Diethyl-pyrocbonat-Wasser) aufgenommen und bei 65°C innerhalb von 5min gelöst. Den Gehalt an Gesamt-RNA bestimmt man durch photometrische Messung, die unter 3.11 näher beschrieben wird.

3.10.2 Gesamt-RNA Isolation aus Air-Liquid-Interface-Kulturen

Zu den unter 3.8 beschriebenen Zeitpunkten wurden je zwei Kollagenmembranen mittels Skalpell aus ihren Plastikhalterungen geschnitten und je 1ml Tri-Reagent LS auf die Zellen gegeben. Mittels eines Zellschabers wurden die Zellen von der Membran gelöst. Das erhaltene Zelllysat wurde wie in 3.10.1 beschrieben weiterbehandelt und so die Gesamt-RNA aus diesen Zellen isoliert.

3.11 Bestimmung des Gesamt-RNA Gehalts

Die gelöste Gesamt-RNA wurde am Photometer gemessen. Hierzu wurde eine 1:50 Verdünnung der Gesamt-RNA in DEPC-Wasser angesetzt, die über die optische Dichte (OD) bei 260nm quantifiziert wurde. Die Quantifizierung wurde unter der Annahme durchgeführt, dass eine Absorption von eins der Menge von 40g/l Einzelstrang-RNA

(ssRNA) entspricht, wobei die Absorption der Verdünnung im linearen Messbereich des Gerätes (OD 0,1-1) zu messen ist. Als Referenzwert wurde das Lösungsmittel DEPC-Wasser eingesetzt. Parallel wurde die Verunreinigung mit Proteinen über die OD bei 280nm bestimmt. Das Verhältnis der OD-Werte bei einer Wellenlänge von 260nm zu 280nm beschreibt die Reinheit der Gesamt-RNA. Die gelöste Gesamt-RNA wurde bei -80°C gelagert.

3.12 cDNA-Synthese

Für die cDNA Synthese wurden 2-5µg Gesamt-RNA eingesetzt (Gubler und Hoffmann, 1983; modifiziert). Zu der Gesamt-RNA wurde in einem ersten Schritt 1µl Oligo-(dt)12-18 Primer (0,5µg/µl) gegeben und für 10min bei 70°C denaturiert. Nach dem Denaturierungsschritt wurde die Probe auf 4°C abgekühlt, mit 4µl 5x First Strand Puffer, 2µl 0,1M DTT, 1µl dNTP-Mix (je 10mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP in TE-Puffer) und 0,4µl Rnase Inhibitor (40U) versetzt und 2min bei 37°C inkubiert. Dem Reaktionsansatz fügte man anschließend 1µl SuperScript Reverse Transkriptase zu und inkubierte diesen für weitere 60 Minuten bei 37°C . Nach Zugabe von 60µl TE-Puffer erfolgte die Inaktivierung des Enzyms nach 10min bei 95°C .

3.13 Real-time RT-PCR

Das Prinzip und die Technik der real time RT-PCR wurde im Rahmen dieser Dissertation in der Arbeitsgruppe am iCycler (Biorad) etabliert.

In einem Reaktionsansatz für die real-time RT-PCR wurden zu der Ausgangs-cDNA (Template-cDNA) 2µl 10x SYBR PCR Puffer, 25mM MgCl_2 , 1,25mM dNTPs, 10pmol Primer (Tab.1) und 0,5U Ampli-Taq-Gold-Polymerase pipettiert. Mit PCR- H_2O wurde der Ansatz auf ein Endvolumen von 20µl aufgefüllt. Ein Reaktionszyklus im iCycler setzt sich wie folgt zusammen:

1. Denaturierung bei 95°C für 35 Sekunden
2. Primer-Hybridisierung (Annealing) und Synthese für 45 Sekunden bei der primerspezifischen Annealingtemperatur

Die beiden Schritte wurden 40x wiederholt. Dem Zyklus geht eine Aktivierung der AmpliTaq-Gold-Polymerase und eine vollständige Denaturierung der Ausgangs cDNA für 10 Minuten bei 95°C voraus.

Die Daten der real-time RT-PCR wurden in jedem Zyklus mehrfach bei der Annealing Temperatur aufgenommen. Anschließend wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Dazu wurde eine Denaturierung bei 95°C für 30 Sekunden und darauf folgend ein Reannealing der PCR Produkte bei 55°C für 30 Sekunden durchgeführt. Die Schmelzkurve besteht aus 80 Zyklen von 55°C auf 95°C mit einer jeweiligen Temperaturerhöhung um jeweils 0,5°C für 7 Sekunden. Die Daten der Schmelzkurve wurden in jedem Zyklus bei einer Erhöhung um jeweils 0,5°C aufgenommen.

Tab. 1: Auflistung der verwendeten Oligonukleotide für die real-time RT-PCR

Gen	Accession	Product Length	Forward Primer (5'→3')	Reverse Primer (5'→3')
CK5	NM_000424	139bp	TGGTCTCCCGTGCCGCAGTTC TAT	ATTGTTGGATTGGGGTGGGA TTCT
CK13	NM_002274	107bp	CCATGAAGAGGTGAGCGGGG ATTG	CTGTGGGGATGGGAAAGGAA GATGTG
CK14	NM_000526	94bp	TGGCCGCGGATGACTTC	CTCGCTCTTGCCGCTCTG
CK18	NM_199187	170bp	AGCGCCAGGCCAGGAGTAT GAGG	TATCCGGCGGGTGGTGGTTCT TTTG
GAPDH	XM_006959	149bp	GGCGATGCTGGCGCTGAGTA C	TGGTCCACACCCATGACGA

3.13.1 Auswertung der real time RT-PCR

Die Analyse der PCR liefert digitale, während der PCR aufgenommene Daten. Aus einem Diagramm, in dem die Fluoreszenz (abgeglichen gegen die Hintergrundfluoreszenz) über die Zeit (in PCR Zyklen) aufgetragen ist, lässt sich der Threshold-Zyklus (C_t) bestimmen. Der C_t -Wert gibt an, in welchem Zyklus die Fluoreszenz einer Probe erstmalig deutlich über der Hintergrundfluoreszenz liegt. Es gilt: Je mehr Ziel-Gen in der Ausgangsprobe vorhanden ist, desto kleiner ist der C_t -Wert. Zudem ist der C_t -Wert abhängig von der Effektivität der PCR-Reaktion, welche hauptsächlich von der Primereffektivität beeinflusst wurde.

3.14 Durchflusszytometrische Analysen

3.14.1 Vorbereitung der Zellen

Primäre humane respiratorische Epithelzellen wurden wie unter 3.1 beschrieben isoliert, wobei anstatt eines Übernacht Verdaus bei 4°C das Gewebe 4h bei 37°C im Inkubator verdaut wurde. Mittels eines Percollgradienten trennte man anschließend die Erythrozyten von den Epithelzellen. Dazu wurden in einem 50ml Probenröhrchen 20ml Percoll mit einer Dichte von 1,077g/ml vorgelegt, mit 10ml der Zellsuspension überschichtet und 15min bei 900g ohne Bremse zentrifugiert. Nach dem Zentrifugationsschritt wurde der in der oberen Phase sichtbare weiße Ring, der die kernhaltigen Zellen enthält, abgenommen. Die so gewonnene Zellfraktion wurde mit PBS gewaschen, in ungefärbter Hank's Salzlösung aufgenommen und die Zellzahl wie unter 3.5 beschrieben bestimmt.

3.14.2 Antikörperfärbung

Die zu untersuchenden Zellen wurden in eine PBS/BSA-Lösung (0,5% BSA in PBS gelöst) überführt und mit dem entsprechenden Antikörper versetzt, wobei ein Gesamtvolumen von 100µl erreicht wurde. Die Inkubation des Zell-Antikörper-Gemisches erfolgte unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur für 30min. Die optimale Antikörperverdünnung wurde in einer Verdünnungsreihe ermittelt, man spricht hier vom Austitrieren des Antikörpers (Tabelle 2). Nach der Inkubation wurden die Zellen mit 1ml

der PBS/BSA-Lösung gewaschen und 10min bei 510g und 4°C abzentrifugiert. Nach dem Waschschrift wurden die markierten Zellen in 250µl PBS/BSA-Lösung aufgenommen. Im direkten Anschluss an die Antikörpermarkierung erfolgt die Messung der PE-markierten Zellen am Durchflußzytometer. Die Zellen, die mit dem Biotin-gekoppelten Antikörper CD3 gefärbt wurden, wurden nachfolgend in einem zweiten Färbeschritt mit Streptavidin-PE (SA-PE) gefärbt. Dazu wurde SA-PE in einer 1:400 Verdünnung zu den markierten Zellen gegeben und 10min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Danach wurde mit 0,5% PBS/BSA Lösung wie zuvor beschrieben gewaschen und die Zellen konnten in 250µl PBS/BSA-Lösung aufgenommen und am Fluoreszenz-durchflusszytometer gemessen werden.

Tab. 2: Antikörperverdünnung für die Färbung der hREC für die Analyse am Durchflusszytometer

Primärantikörper	Verdünnung
CD49f – PE (Mouse, Anti-Human)	1:10
CD104 – PE (Mouse, Anti-Human)	1:200
CD104 – PE (Mouse, Anti-Human) für die Sortierung am FACS	1:75
CD3 – Biotin (Mouse, Anti-Human)	1:800
Streptavidin-PE ¹	1:400

¹ Hierbei handelt es sich nicht um einen Antikörper sondern um die Sekundärfärbung für die Biotin-Streptavidin Kopplung

3.14.3 Vorarbeiten am Durchflusszytometer und Messung der Proben

Das Fluoreszenzdurchflusszytometer ist direkt mit einem Computer (Apple/MacIntosh; iMAC) zur digitalen Verarbeitung der Ergebnisse verbunden. Zunächst wurden die Kapillaren des Fluoreszenzdurchflusszytometers mit destillierten Wasser (Aqua bidest.) gespült. Danach wurde die Probe gemessen. Bei einer zweiten Messung der gleichen Probe

wurden zusätzlich mit 2µl 0,1mg/ml Propidiumiodid (PI) zugegeben, das avitale Zellen anfärbte. Die Aufnahme der Ergebnisse erfolgte in einem Dot Plot bzw. in einem Density Plot, in dem zunächst die Rauigkeit der Zellen (SSC) über der Größe der Zellen (FSC) aufgenommen und dargestellt wurde. Zusätzlich konnten nun die Detektoren, die Licht unterschiedlicher Wellenlängen detektieren, ausgewählt werden. So ließen sich die Proben unter geeigneter Anregungsenergie analysieren. Die aufgenommenen Daten wurden anschließend mit der Auswertungssoftware Cellquest der Firma BD Bioscience analysiert und als zweidimensionale Dot-Plot-Diagramme dargestellt.

3.14.4 Gewinnung der Basalzellen durch FACS

Für die Gewinnung der markierten Zellen mussten diese aus dem Zellgemisch separiert werden. Dazu wurden die primären hREC mit dem Antikörper CD104-PE in der Verdünnung 1:75 für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und die markierten Zellen zur Sortierung eingesetzt. Da das für die Sortierung verwendete FACS nicht so sensitiv ist, wie das Durchflusszytometer, das zur Analyse von Zellen verwendet wurde, musste in diesem Fall der Antikörper in höherer Konzentration eingesetzt werden. Die separierten Zellen wurden anschließend in Reaktionsgefäßen aufgefangen und mit AECG-Medium in Zellkulturflaschen ausgesät und im Inkubator kultiviert.

3.15 *In vitro* Co-Kultursysteme

3.15.1 Co-Kultivierung von respiratorischen Epithelzellen und nativem Gelenkknorpel

Bei der Herstellung von Co-Kulturen wurden jeweils 5×10^5 humane respiratorische Epithelzellen in 10µl AECG-Medium resuspendiert und auf jeweils einen 0,5cm² großen Gelenkknorpelchip, der zuvor in eine 12 Well-Platte gelegt wurde, getropft. Nach einer Inkubation von 3h bei 37°C im Brutschrank pipettierte man 1ml und nach 24h noch 1ml Nährmedium dazu. Die Kultivierungsdauer betrug 7 bzw. 14 Tage. Alle zwei Tage wurde ein Mediumwechsel vorgenommen. Nach dieser Zeit wurden die Co-Kulturen kryokonserviert und Kryoschnitte für die histologische Färbung angefertigt.

3.15.2 Co-Kultivierung von respiratorischen Epithelzellen und *in vitro* gezüchteten Knorpelpellets

Nach drei Wochen wurden die Knorpelpellets in 48-Well-Platten überführt und immobilisiert, indem sie mit jeweils 5µl Matrigel an den Boden der Zellkulturplatten geklebt wurden. 1×10^5 humane respiratorische Epithelzellen der Passage 1 wurden in AECG-Medium resuspendiert, auf jeweils ein Pellet aufgetropft und das Konstrukt für 30min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss wurde je 1ml AECG-Medium oder alternativ konditioniertes Medium zu den Konstrukten gegeben und über 14 Tage im Brutschrank kultiviert und für die anschließenden Färbungen mit den AK CD44v6 und 34ßE12 kryokonserviert.

3.15.3 Co-Kultivierung von respiratorischen Epithelzellen und humanen Knorpelzellen auf Kollagenmembranen

Die Kollagenmembran (Cellagen Disc) wurde durch einen Plastikring, auf dem kleine Füßchen befestigt sind, stabilisiert. Da die Membran auf der Unterseite mit Zellen besiedelt werden musste, legte man sie in eine 6-Well-Platte mit dem Plastikring nach oben und pipettiert 5×10^4 Chondrozyten pro 1,5ml RPMI-Medium auf die Membran. Nach 24 Stunden waren die Chondrozyten adhärent und das Cellagen Disc konnte durch Drehen mit einer sterilen Pinzette wieder in seine richtige Position gebracht werden. Nach Konfluenz der Chondrozyten (ca. 48h) wurde das RPMI Medium abgesaugt und eine Zellsuspension von 5×10^5 respiratorische Epithelzellen in 1,5ml AECG-Medium auf die Oberseite der Membran gesät. Die Unterseite wurde nun mit 2,5ml AECG-Medium gefüllt. Der Mediumwechsel erfolgte alle zwei Tage.

Der Zeitpunkt der Konfluenz der respiratorischen Epithelzellen wurde als Tag 0 definiert. Es wurden zwei Experimente durchgeführt, die parallel liefen. Im ersten wurde am Tag 0 der Co-Kultivierung das Medium oberhalb der Membran abgesaugt, sodass die respiratorischen Epithelzellen sich zum einen oberhalb in einer Gasphase befanden, zum anderen die Knorpelzellen unterhalb der Membran in einer flüssigen Phase (dem Nährmedium), verblieben. Man nennt diese Art der Kultivierung Air-Liquid-Interface Kultur. Im zweiten Experiment waren die respiratorischen Epithelzellen vollständig mit

Medium bedeckt (Immersionskultur), wobei das Medium alle zwei Tage gewechselt wurde. Jeweils am Tag 0, 4 und 8 wurden die Co-Kulturen in Tissue Tek eingebettet und Kryoschnitte für die Histologie angefertigt.

3.15.4 Herstellung von Co-Kulturen aus nativen humanen Gelenk-knorpelchips und humanen respiratorischen Epithelzellen

Humane Gelenkknorpelchips mit einem Durchmesser von ca. 0,5cm wurden mit einer sterilen Pinzette in 24-Well-Platten gegeben. Auf die Knorpelchips wurde 1ml einer Fibroblastenzellsuspension mit einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml gegeben und 48h im Brutschrank mit RPMI-Kulturmedium inkubiert. Nach 24h erfolgte ein Mediumwechsel zu 3/4 des Gesamtvolumens an Kulturmedium. Nach 48h wurde das Kulturmedium vollständig entfernt und humane respiratorische Epithelzellen der Passage 1 mit einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml in einem Gemisch aus RPMI-Kulturmedium und AECG-Medium 1:1 (v/v) auf die Kulturen pipettiert. Alle 24h wurde das Medium wieder zu 3/4 abgesaugt und mit frischem RPMI-Kulturmedium/AECGM 1:1 (v/v) versetzt.

3.16 Immunhistochemische und histologische Untersuchungen

3.16.1 Kryo-Einbettung des Probenmaterials und Anfertigung von Kryoschnitten

Die Co-Kultur bzw. die Nasenmuschelspitze wurden mit Eindeckmedium luftblasenfrei in speziellen Plastikschaalen eingebettet. Die so behandelten und anschließend langsam in flüssigem Stickstoff eingefrorenen Proben wurden bis zum Schneiden bei -80°C gelagert.

Das Schneiden der Kryoblöcke erfolgte am Kryostaten bei ca. -20°C . Die Schnittstärke betrug $6\mu\text{m}$. Um eine gute Haftung der Gewebe auf einem Objektträger zu gewährleisten, benutzte man speziell behandelte Super Frost Plus Objektträger. Die Kryoschnitte wurden 24h bei Raumtemperatur getrocknet und entweder gleich gefärbt oder bei -20°C zusammen mit Silikagel (feuchtigkeitsminderndes Mittel) gelagert.

3.16.2 Fixierung von Air-Liquid-Interface und Chamber Slides Kulturen

Für die immunhistochemische und histologische Färbung von Zellen wurden Chamber Slides verwendet. Es handelte sich um Objektträger aus TPX-Permanox, auf die acht gleich große Kammern geklebt waren, die zum Eindecken leicht entfernt werden konnten. Die Zellen wurden wie in einer Zellkulturflasche im Monolayer bis zur Färbung kultiviert. Der Vorteil dieser Chamber Slides ist, dass man nur eine geringe Zahl an Zellen benötigt und zudem mehrere Antikörper gleichzeitig testen kann.

Unter den vielen Fixierungsmöglichkeiten hat sich die Fixierung mit einem Aceton/Methanol-Gemisch (1:1 v/v) für die zu untersuchenden Zellarten als optimal erwiesen.

Zunächst saugt man das Nährmedium ab, wäscht die Zellen 1x mit PBS-Puffer, überschichtet diese mit dem Aceton/Methanol-Gemisch und lässt die Zellen 10min bei Raumtemperatur inkubieren. Anschließend wurde das Gemisch abgesaugt und entweder beginnt man mit der immunhistochemischen Färbung, oder man überschichtet die ALI-Kulturen bzw. Chamber Slides mit PBS-Puffer und lagerte diese für 1-2 Tage bei 4°C

Diese Lagerung wurde notwendig, da Kulturen mit unterschiedlichen Kultivierungszeiten unter gleichen Bedingungen gefärbt werden sollten.

3.16.3 Alcian-Blau-Färbung

Die Alcian-Blau-Färbung dient zur Anfärbung saurer Mukopolysaccharide. Saure Polysaccharide befinden sich unter anderem in der Knorpelmatrix, die somit gut dargestellt werden kann.

Die aufgetauten Kryoschnitte, bzw. die Chamber Slides und Air-Liquid-Kulturen wurden mit 3%iger Essigsäure eingestellt und für 30min bei Raumtemperatur in einer Lösung aus 1%igem Alcian Blau 8GX in 3%iger Essigsäure inkubiert. Der pH-Wert soll etwa 2,5 betragen. Nach mehrmaligem Spülen in 3%iger Essigsäure und Waschen in Aqua dest. erfolgte die Gegenfärbung mit Kernechtrot (5g Aluminiumsulfat auf 100ml Aqua dest. + 0,1g Kernechtrot) für 4-5min bei Raumtemperatur. Nach erneutem Spülen in Aqua dest.

wurden die Schnitte bzw. die ALI-Kulturen in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und über Xylol in Kanadabalsam eingedeckt. Die Chamber Slides dagegen durften nicht mit Xylol in Berührung kommen und wurden deshalb nicht entwässert, sondern nach dem Spülen mit einem wässrigen Medium (Aquatex) eingedeckt.

3.16.4 Masson-Goldner Trichrom Färbung

Die Masson Goldner Trichromfärbung ist zur Darstellung von kollagenen Bindegewebsfasern geeignet, die sowohl in der Knorpelmatrix als auch in der Basalmembran vorhanden sind und grün angefärbt werden.

Die aufgetauten Kryoschnitte wurden kurz getrocknet und für 2min in einer Eisenhämatoxylinlösung nach Weigert (1:1 Gemisch aus 1% Hämatoxylin in 96% Ethanol und 1,16g Eisen(III)-Chlorid in 98ml Aqua dest. und 4ml 1N HCL) bei RT inkubiert. Anschließend wurde der überschüssige Farbstoff mit Leitungswasser ausgewaschen. Im zweiten Färbeschritt wurden die Kryoschnitte 5-10min in Säurefuchsin-Ponceau (0,2g Ponceau de Xylidine und 0,1g Säurefuchsin in 300ml Aqua dest. und 0,6ml Eisessig) gefärbt und mit 1%iger Essigsäure gespült. Zur Vorbereitung auf die nächste Färbung wurde der Kryoschnitt 15-30sec in Phosphormolibdänsäure-Orange G-Beizlösung (3,0g Phosphormolibdänsäure und 2g Orange G in 100ml Aqua dest.) gebeizt. Mit 1% Essigsäure wurde der Farbstoff fixiert und die Beizung unterbrochen. Darauf folgte die Färbung mit Lichtgrün (0,1g Lichtgrün in 100ml Aqua dest. und 0,2ml Eisessig) für 5min gefolgt von einem 5min Spülschritt mit 1% Essigsäure. In einem letzten Schritt wurden die Kryoschnitte drei Mal 5min mit 100% Alkohol entwässert und über Xylol in Kanadabalsam eingedeckt.

3.16.5 Hämatoxylin / Eosin Färbung

Diese Färbung dient als Übersichtsfärbung. Zellplasma stellt sich rosa dar, Zellkerne sowie Knorpelmatrix blau.

Nach 5min Fixierung der Kryoschnitte in Aceton/Methanol (1:1 v/v) wurden die Präparate 2-5min in Aqua dest. gespült und dann mit Hämalun nach Meyer für 7-10min inkubiert.

Nach kurzem Spülen der Kryoschnitte in Aqua dest. und 1% HCl-Ethanol erfolgt der Farbumschlag von violett nach blau unter fließendem Leitungswasser für ca. 30min. Anschließend wurden die Präparate kurz in Aqua dest. gespült und 4min mit Eosin (3g Eosin in 300ml 70% Ethanol) gefärbt. Nachfolgend wurden die Schnitte in 96% und 100% Ethanol entwässert und über Xylol in Kanadabalsam eingedeckt.

3.16.6 Immunhistochemische Färbungen

Als Detektionssystem wurde die DAKO EnVision HRP-Maus-AEC Methode gewählt. Dieses System basiert auf einem enzymmarkierten (HRP), wasserlöslichen Polymer, an das Sekundärantikörper (Ziege, Anti-Maus) konjugiert wurden. Die Vorteile gegenüber z.B. den Streptavidin-Biotin-Techniken sind die 2-Schritt-Methode und die höhere Sensitivität.

Die aufgetauten Kryoschnitte bzw. die mit PBS-Puffer überschichteten Chamber Slides und die Air-Liquid-Interface-Kulturen wurden nach kurzer Trocknung 5min im kalten Aceton/Methanol-Gemisch fixiert. Vor dem Färben kamen alle Proben für ca. 30 min zum Trocknen in den Wärmeschrank bei 37°C.

Alle folgenden Schritte wurden in der feuchten Kammer durchgeführt. Da es sich bei der EnVision-Methode um ein Peroxidase-System handelt, musste die endogene Peroxidase mit 3%igem H₂O₂ geblockt werden (5min bei RT). Nach anschließendem Waschen in PBS-Puffer folgte die Proteinblockierung (20min RT) mit 10%igem Ziegenserum (da es sich um EnVision Ziege, Anti-Maus handelte), um eine unspezifische Hintergrundfärbung auszuschließen. Nach erneutem Waschen folgt die Inkubation mit den jeweiligen primären Antikörpern (Maus, Anti-Human) für 30min bei 37°C.

Zum Nachweis von Basalzellen in humanen respiratorischen Epithelzell-Kulturen wurden folgende monoklonale Antikörper eingesetzt:

Tab. 3: Antikörperversdünnung für die immunhistochemische Färbung der hREC

Primärantikörper	Verdünnung
Maus, Anti-Human CD44v6	1:500
Maus, Anti-Human 34ßE12	1:50
Maus, Anti-Human CD49f	1:500
Maus, Anti Human CD104	1:500

Als Negativ-Kontrolle diente ein IgG1-Antikörper. Nach der Inkubation folgten drei Waschschritte mit PBS-Puffer.

Im nächsten Schritt wurde das gebrauchsfertige Polymer-Konjugat (Ziege, Anti-Maus) auf die Schnitte pipettiert und 30min bei 37°C inkubiert. Nach erneutem Waschen (3x) folgte die Substratumsetzung mit der Chromogen-Substrat-Lösung (AEC) für ca. acht bis zehn Minuten bei RT.

Zum Schluss erfolgte nach erneutem Waschen in Aqua dest. die Kernfärbung mit Hämatoxylin nach Meyer für 5min. Zum Bläuen der Zellkerne wurden die Proben bis zu 30min in Leitungswasser gestellt und anschließend mit einem wässrigen Medium (Aquatex) eingedeckt.

3.17 Rasterelektronenmikroskopie

Das native Gewebe und die Air-Liquid-Interface-Kulturen (ALI-Kulturen) wurden in 5% Glutaraldehyd in PBS für 2h bei RT fixiert. Anschließend wurden die Proben über eine aufsteigende Alkoholreihe für je 10 min von 50% bis 90% Ethanol (in 10% Schritten) und zuletzt in 100%igem Ethanol drei Mal 10min entwässert. Die Entwässerung wurde mit einer Kritisch-Punkt-Trocknung abgeschlossen, da die sonst verbleibenden Wassermoleküle ein Hochvakuum in der Probenkammer des Rasterelektronenmikroskops unmöglich machen würden. Bei der Kritisch-Punkt-Trocknung wurde die Restfeuchte der

Proben durch mehrmaliges Spülen mit flüssigen CO₂ ersetzt. Die eigentliche Trocknung erfolgte danach bei 37,8°C und 50bar, wobei das CO₂ entfernt wurde, sodass die Probe beim Trocknungsvorgang nicht schrumpfte, sondern alle Strukturen erhalten blieben.

Es folgte das Beschichten der Proben mit Gold-Paladium (Schichtdicke 20nm) in einem Sputtergerät. Die Auswertung der Proben erfolgte an einem Rasterelektronenmikroskop unter Hochvakuum (10^{-5} MPa). Im Rasterelektronenmikroskop können Oberflächenstrukturen dargestellt werden, sodass sich diese Methode zum Nachweis von Flimmerzellen und bedingt für Becherzellen eignet.

4 Ergebnisse

4.1 Kultivierung von humanen respiratorischen Epithelzellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Isolation und Vermehrung von humanen respiratorischen Epithelzellen (hREC) in der Arbeitsgruppe etabliert. Das respiratorische Epithel der Nasenmuschel konnte durch den enzymatischen Verdau gezielt von der darunter liegenden Basalmembran abgelöst werden. Die Basalmembran blieb dabei intakt auf der Submukosa zurück (Abb .9).

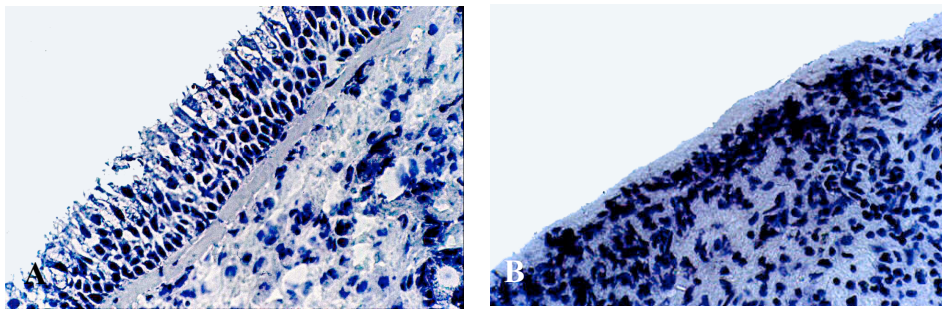


Abb. 9: Gewebeschnitt einer Nasenmuschel; **A** vor dem Verdau; **B** nach dem Verdau; Hämatoxylin Färbung; 400fach vergrößert

Die humanen respiratorischen Epithelzellen lagen nach dem Verdau jedoch nicht ausschließlich einzeln vor. Vielmehr enthielt die Zellsuspension noch einige Zellaggregate, die nicht vollständig enzymatisch verdaut worden sind und aufgrund der Porengröße der verwendeten Filter nicht herausgefiltert werden konnten.

Die Zilienzellen zeigten auch nach dem Verdau noch teilweise Aktivität, die sich am Phasenkontrastmikroskop als rotierende Zellen mit Zilienschlag darstellte. Dagegen waren die Becherzellen von den Basalzellen im Phasenkontrastmikroskop nicht zu unterscheiden (keine Abbildung).

Die Zellvermehrung erfolgte in Kollagen A beschichteten Zellkulturflaschen. Bereits nach ca. 8h Stunden zeigten die hREC ein typisches Adhäsions- und Proliferationsverhalten (Abb. 10A). Die Adhäsion der Zellen war nach ca. 20h

abgeschlossen (Abb. 10B). Die Zellen wiesen eine kleine runde Form auf und wuchsen zunächst in Inseln (Abb. 10C). Während der Proliferation kam es zu einer eher gleichmäßigen Ausbreitung der Zellen auf der Kulturoberfläche (Abb. 10D). Da nach ca. 20h die Adhäsion an der Kulturoberfläche beendet war, konnte somit ein erster Mediumwechsel nach 24h durchgeführt werden, ohne einen Verlust von hREC befürchten zu müssen. Nur die nicht-adhärenenten Zellen, Zelldebris und Erythrozyten wurden bei dem Mediumwechsel entfernt.

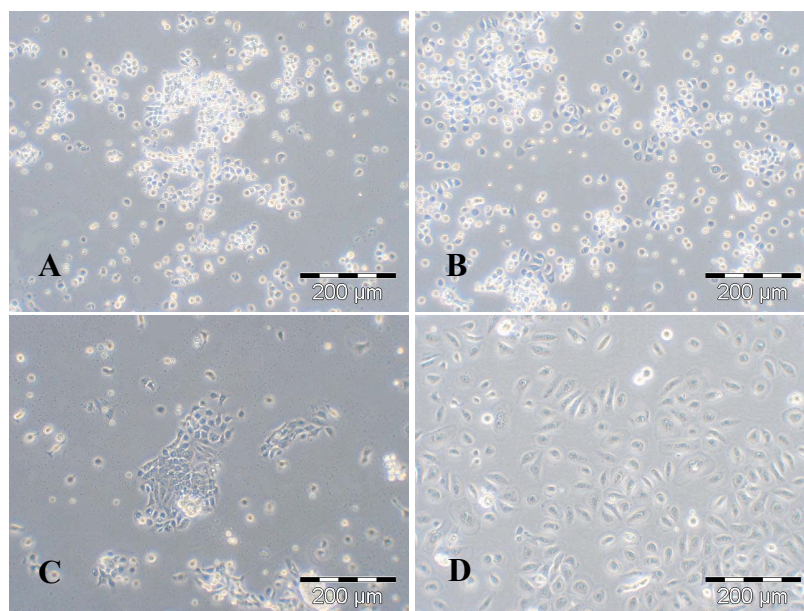


Abb. 10: Proliferationsverhalten der primären humanen respiratorischen Epithelzellen; **A** 8h; **B** 20h; **C** 1 Tag; **D** 4 Tage in Kultur

Im Gegensatz zu Chondrozyten wurden die hREC bereits beim Erreichen einer 70%igen Konfluenz passagiert (Abb. 10D). Zu diesem Zeitpunkt war noch ein Ablösen der Zellen vom Kulturflaschenboden mit Trypsin/EDTA und damit eine Vermehrung der Zellen durch weitere Passagen möglich. In diesem Stadium hatten die hREC noch keinen ausgeprägten Zell-Zellkontakt und wuchsen als einschichtige Monolayer Kultur. Bei 100%iger Konfluenz der hREC kam es nicht zu einer Kontaktinhibition und die Zellen begannen mehrschichtige Multilayer zu bilden, was ein Trypsinieren und nachfolgendes

Vereinzeln der Zellen erschwerte. Durch wiederholtes Passagieren der hREC nach 70%iger Konfluenz zeigte sich, dass die Zellen nur begrenzt kultivierbar sind.

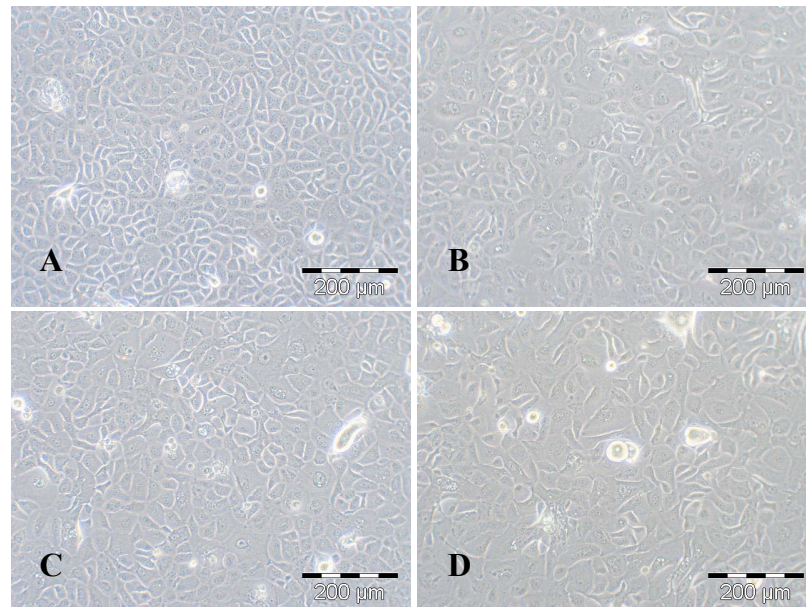


Abb. 11: Morphologie der humanen respiratorischen Epithelzellen, 5 Tage in Kultur; **A** P0; **B** P1; **C** P2; **D** P3

Neben einer morphologischen Veränderung, wie die Zunahme der Zellgröße über mehrere Passagen, nahm die Vitalität der Zellen über die Passagen ab, sodass die Kultivierung nach der fünften Passage abgebrochen wurde (Abb. 11 A-D).

4.2 Durchflusszytometrie

Die Methode der fluoreszenzaktivierten Zellsortierung (FACS) wurde im Rahmen dieser Arbeit für humane respiratorische Epithelzellen etabliert.

Frisch isolierte humane respiratorische Epithelzellen wurden zunächst mittels der FACS Analyse auf ihren Gehalt an Basalzellen, die als teilungs- und differenzierungsfähig gelten, untersucht. Im ersten Schritt erfolgte die Auswahl der zu untersuchenden Zellpopulation in einer Propidiumiodid gefärbten Zellsuspension in einem Dot-Plot-

Diagramm. Ein grundlegendes Problem besteht darin, dass avitale Zellen Antikörper durch die gestörte Membranschranke in ihr Zytoplasma aufnehmen. Ein Lösungsansatz schafft die Gegenfärbung der avitalen Zellen mit PI (Propidiumiodid). Durch den Zusatz von PI zu der Zellsuspension wurden avitale Zellen markiert und konnten deshalb neben den vitalen Zellen dargestellt werden, da dieser Farbstoff durch die beschädigte Plasmamembran nekrotischer Zellen diffundiert und sich in die DNA einlagert. Die untersuchte Zellsuspension bestanden aus einer kleinzelligen und einer großzelligen Population, wobei der FSC-Kanal des Density Plots die relative Größe der Zellen darstellt (Abb. 12A). Um Debris von der Analyse auszugrenzen, wurde die großzellige Population durch Setzen des Gates R1 eingegrenzt. Nur Zellen aus diesem abgegrenzten Bereich wurden zur weiteren Auswertung verwendet. Mit Hilfe der Quadrantenstatistik konnte die Vitalität der Zellen im Gate R1 errechnet werden, sie lag bei 78%.

Die vitalen Zellen wurden durch ein weiteres Gate (Gate R2) eingegrenzt und der Dot-Plot durch das Setzen eines Fadenkreuzes in 4 Quadranten zur Unterscheidung positiver und negativer Antikörperbindungen unterteilt. Die vitalen Zellen der PI gefärbten Zellsuspension lagen in dem Quadranten, der hinsichtlich beider Bindungsmerkmale negativ war (Abb. 12B, Quadrant links unten). Die toten Zellen des Gates R1 lagen im PI positiven Quadranten (Abb. 12B, Quadrant links oben). Mit diesem Dot-Plot wurden anschließend die mit den Antikörpern CD104 (Abb. 12C) und CD49f (Abb. 12D) gefärbten Zellen ausgewertet.

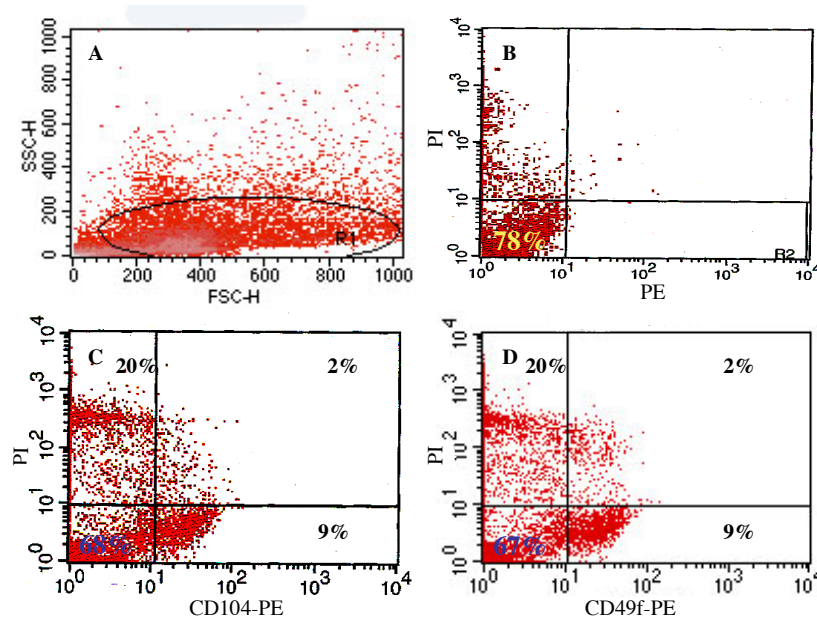


Abb. 12: FACS Analyse primärer hREC. **A** Gesamtpopulation mit Gate R1, **B** mit PI gefärbte Zellen aus Gate R1, vitale Zellen (78%) im Gate R2, **C** Färbung der vitalen Zellen mit CD104-PE, **D** Färbung der vitalen Zellen mit CD49f-PE

Insgesamt 9% der mit CD49f-PE markierten Zellen zeigten im Dot-Plot eine vitale gefärbte Zellpopulation im rechten unteren Quadranten. Hingegen wurden 67% der Zellen nicht von dem Antikörper markiert. Weitere 2% der Zellen wurden nicht nur von dem Antikörper gebunden, sondern auch PI markiert. 20% der Zellen wurden PI markiert und haben nicht an den Antikörper gebunden. Der CD104-PE Antikörper zeigte ein ähnliches Bild wie der CD49f-PE. Auch hier konnten in allen 4 Quadranten Zellen detektiert werden: 9% vitale gefärbte und 68% vitale ungefärbte Zellen sowie 20% avitale ungefärbte Zellen und 2% tote gefärbte Zellen (Abb. 12 C-D).

Für die Isotypenkontrolle wurde der blutzellenspezifische Antikörper CD3-PE ausgewählt, der nicht auf respiratorischen Epithelzellen exprimiert wird. Wie erwartet, färbten sich nur vereinzelt Zellen an (<0,8%; Daten nicht abgebildet).

In einer weiteren Analyse wurden primäre hREC unter Verwendung des AK CD104 mittels FACS (Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung) sortiert. Dafür wurde zunächst eine DAPI/PI (4',6-Diamidino-2-phenylindol/Propidiumiodid) gefärbte Zellsuspension

analysiert und um die vitalen Zellen das Gate P1 gelegt (Abb. 13A). Als nächstes wurden die mit dem AK CD104 markierten Zellen untersucht. Um die vitalen CD104 markierten Zellen wurde das Gate P2 gelegt und die Zellen innerhalb des Gates in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Die ungefärbten vitalen Zellen wurden durch das Gate P3 eingegrenzt und diese Zellen in ein weiteres Reaktionsgefäß überführt (Abb. 13B).

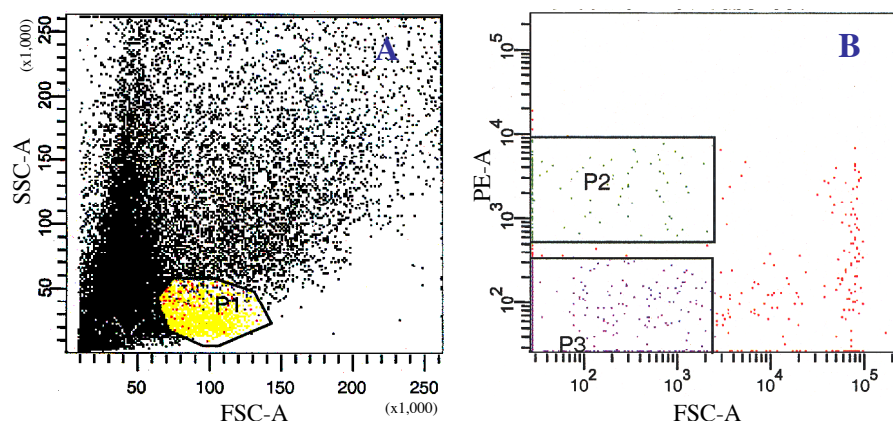


Abb. 13: FACS von primären hREC. **A** Setzen des Gates P1 um vitale Zellen der PI/DAPI gefärbten Zellpopulation (P1), **B** vitale CD104-PE positiv markierte Zellen im Gate P2 und unmarkierte Zellen im Gate P3

Die so gewonnenen Zellen wurden in Zellkulturflaschen ausgesät und im Inkubator mit AECG-Medium kultiviert. Die Zellen adhärten nur sehr vereinzelt an der Kulturoberfläche und proliferierten nicht (Abbildungen nicht gezeigt). Eine Kultivierung dieser Zellen gelang somit nicht.

4.3 Differenzierung und Charakterisierung von humanen respiratorischen Epithelzellen in Zellkulturflaschen

Voraussetzung für eine Zilienbildung ist die Differenzierung der Epithelzelle. Als Nachweis wurden zunächst einfache Differenzierungskulturen in Zellkulturflaschen ohne spezielle Differenzierungsfaktoren angesetzt. Wie bereit beschrieben, bildeten die hREC nach Erreichen einer 70%igen Konfluenz eine für die Epithelzellen typische

kopfsteinpflasterartige Morphologie und hatten Zell-Zellkontakt. Die Zellen wuchsen nach 100%iger Konfluenz mit zunehmender Kulturdauer in mehreren netzartigen Schichten als Multilayer übereinander. In diesem Stadium lag die Vermutung nahe, dass die hREC zu differenzieren begannen.

Für die Differenzierungskulturen wurden Zellen aus erster Passage (P1) in die mit Kollagen A beschichteten Zellkulturflaschen ausgesät und bis zur 100%igen Konfluenz kultiviert (Abb. 14A). Dieser Zeitpunkt wurde als Tag 0 definiert.

Der Zellrasen wurde ab Tag 4 dichter, die Größe der einzelnen Zelle nahm zu (Abb. 14B/C) und ab Tag 12 bildete sich ein Multilayer aus (Abb. 14D). Da die obere Zellschicht netzartig auf der unteren wuchs, war eine histologische und immunhistochemische Beurteilung bis hin zur unteren Zellschicht möglich.

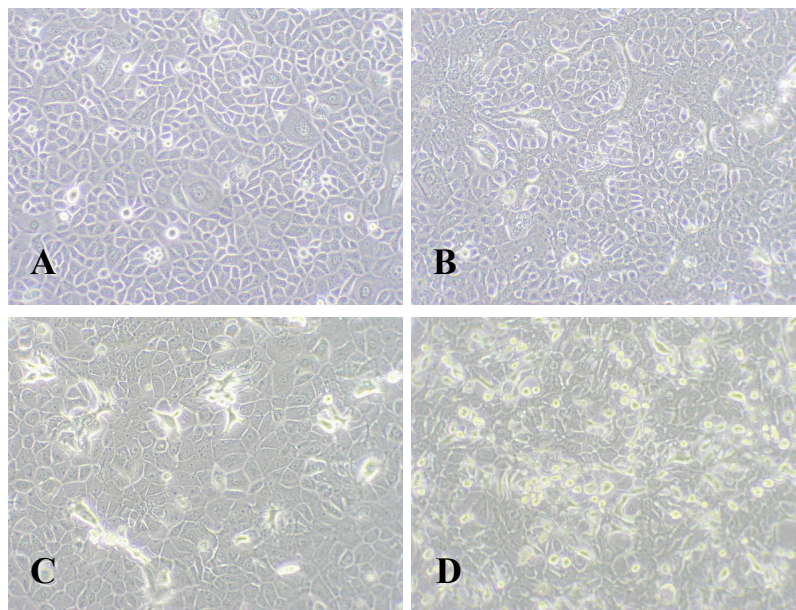


Abb. 14: Differenzierungskulturen in Zellkulturflaschen; **A** 100%ige Konfluenz (Tag 0); **B** Tag 4 nach Konfluenz; **C** Tag 8 nach Konfluenz; **D** Tag 12 nach Konfluenz

4.3.1 Histologie

Die Hämatoxilin/Eosin- und Masson-Goldner-Färbung dienten als Übersichtsfärbungen am nativen Nasenmuschelgewebe. Insbesondere konnten mit der Masson-Goldner-Trichromfärbung die Basalmembran und das respiratorische Epithelgewebe mit dem Ziliensaum prägnant dargestellt werden (Abb. 2A). Auch zeigten die Hämatoxilin/Eosin Färbungen, dass das respiratorische Epithel der Nasenmuscheln bei der OP und auch durch den enzymatischen Verdau weitgehend unversehrt blieb (Abb. 2B und Abb. 9).

Für die Darstellung der Becherzellen sowohl im nativen Nasenmuschelgewebe als auch in den Differenzierungskulturen (100% Konfluenz) wurde die Alcian-Blau-Färbung gewählt. Mit dieser wurden die sauren Polysaccharide innerhalb der Becherzellen nachgewiesen (Abb. 15A). Der Mucus färbte sich leuchtend blau und die Zellkerne durch die Gegenfärbung mit Kernechtrot-Aluminiumsulfat hellrot an. Der Hintergrund erschien hellrosa.

Der Nachweis der sauren Polysaccharide in der Differenzierungskultur konnte nur in der Primärkultur und vereinzelt in Passage 1 erbracht werden. In höheren Passagen nahm die Anzahl der mit Mucus-Substanzen gefüllten Becherzellen stetig ab (Abb. 15B-15D) Ab Passage 2 war keine Blaufärbung mehr zu verzeichnen (Abb. 15D).

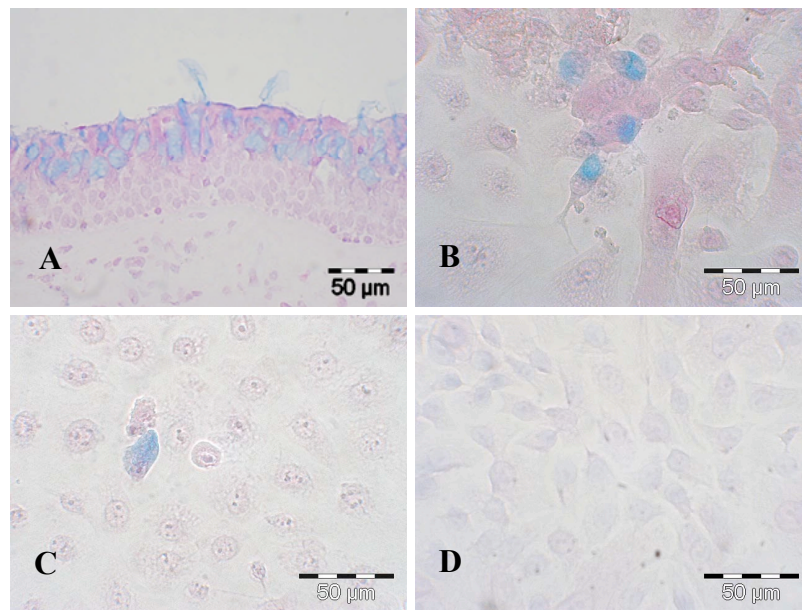


Abb. 15: Alcian-Blau Färbung des respiratorischen Epithels von humanen Nasenmuscheln; **A** Becherzellen mit Zilien; **B** Differenzierungskultur P0; **C** Differenzierungskultur P1; **D** Differenzierungskultur P2

3.3.2. Immunhistochemie

Für eine weitere Charakterisierung der Differenzierungskulturen aus humanen respiratorischen Epithelzellen wurden folgende vier monoklonale Antikörper eingesetzt: Bei dem Basalzellmarker CD44v6 handelt es sich um ein Cytokeratin, das ein Oberflächenantigen der Basalzelle erkennt. Der ebenfalls als Basalzellmarker beschriebene 34 β E12 ist ein intrazellulärer Marker, es handelt sich ebenfalls um ein Cytokeratin.

Die Antikörper CD49f und CD104 reagieren mit speziellen Integrinen (Hemidesmosomen), die auf Basalzellen exprimiert werden und zwar an der Kontaktfläche zwischen Basalmembran und Basalzelle. Die Aufgabe dieser Integrine ist es, eine Verbindung der Proteine aus der Basalmembran mit dem Keratinfilamentnetzwerk der Basalzellen herzustellen [82]. Der CD49f Antikörper bindet an das α 6-Integrin, das mit dem von CD104 Antikörper gebundenen β 4-Integrin den α 6- β 4-Komplex bildet.

Alle Antikörper wurden zunächst am nativen Nasenmuschelgewebe getestet. Dieses Gewebe diente als positive Gewebekontrolle, um die Anwesenheit des gesuchten Antigens zu überwachen.

Der als Basalzellmarker beschriebene 34 β E12 Antikörper färbte neben den Basalzellen auch die intraepithelialen Becherzellen und die Drüsenzellen im subepithelialen Gewebe rötlich bis braun an (Abb. 16A/B). Daraus kann gefolgert werden, dass der AK 34 β E12 keine spezifische Bindung für das Basalzell-Antigen hat, weil er auch andere Antigene bindet. Die parallel gefärbte Kontrolle (Maus IgG1) war negativ (Abb. 16C/D).

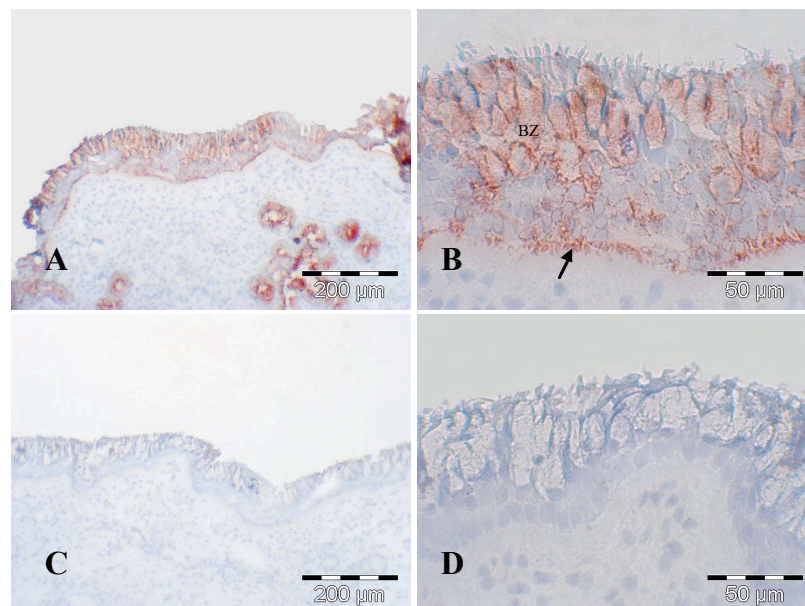


Abb. 16: Immunhistochemische Färbung des humanen respiratorischen Epithels von Nasenmuscheln mit dem 34 β E12 AK; **A** Übersicht; **B** Basalzellen (→), Becherzellen (BZ); **C** und **D** Negativkontrolle

Der Basalzellmarker 34 β E12 färbte alle Zellen der *in vitro* Primärzellkultur sowie alle Zellen der Passagen 1-3 gleichmäßig rötlich braun an (Abb. 17A-D). Eine Unterscheidung der Basal- und Becherzellen war mit diesem AK nicht möglich, d.h. sowohl Basalzellen als auch Becherzellen konnten in der Kultur vorhanden gewesen sein. Die parallel gefärbte Kontrolle (Maus IgG1) war negativ (nicht abgebildet).

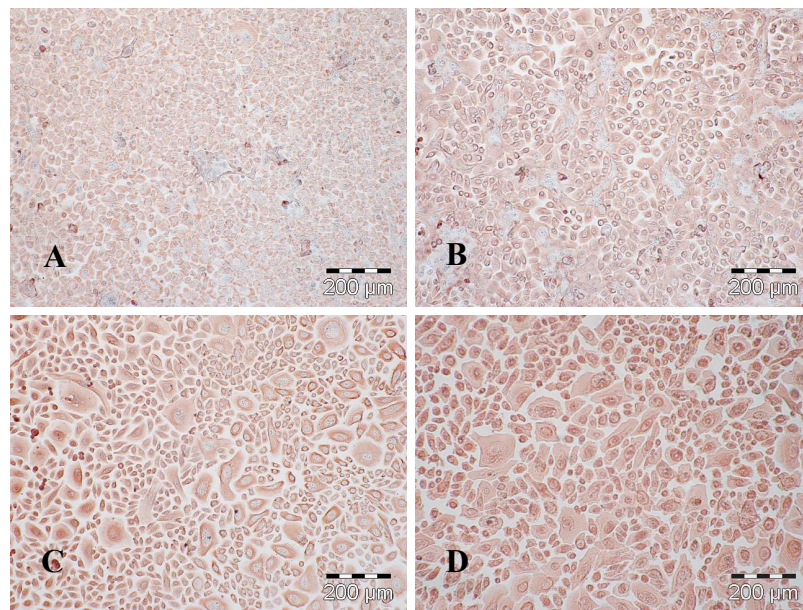


Abb. 17: Immunhistochemische Färbung von Zellkulturen des humanen respiratorischen Epithels aus Nasenmuscheln mit dem AK 34βE12; **A** primäre Zellen; **B** P1; **C** P2; **D** P3

Die Bindungsspezifität des Antikörpers CD44v6 an die hREC-Antigene wurde ebenfalls an nativen Nasenmuschel-Gewebeschnitten nachgewiesen (Abb. 18A). Ausschließlich respiratorische Epithelzellen, die als verhältnismäßig kleine Zellen auf der Basalmembran zu erkennen sind, wurden rötlich braun angefärbt.

Ein gleichzeitig mit dem Maus IgG1 Antikörper gefärbter Gewebeschnitt (Negativkontrolle) zeigte keine Färbung (Abb. 18B).

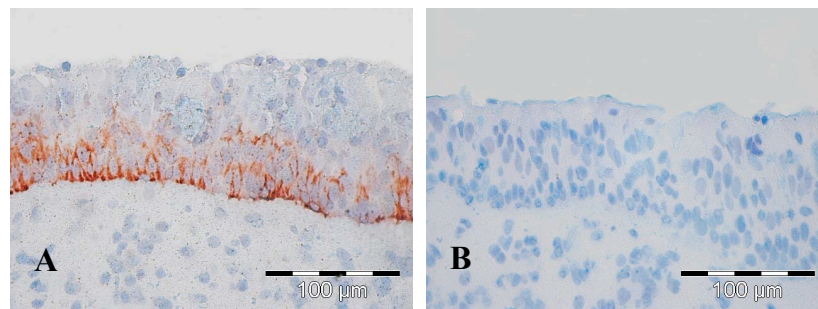


Abb. 18: Immunhistochemische Färbung des humanen respiratorischen Epithels aus Nasenmuscheln mit dem CD44v6 AK (A); Negativkontrolle (B).

Die Färbung der hREC-Kulturen in Passage 0 und Passage 1 zeigte, dass alle hREC, die direkten Kontakt zum mit Kollagen A beschichteten Flaschenboden hatten, sich mit dem CD44v6 AK braun angefärbt haben (Abb. 19A/B). Zellen, die sich in den oberen Schichten befanden, zeigten dagegen keine Anfärbung mit dem AK (Abb. 19B/D). Die parallel gefärbte Kontrolle (Maus IgG1) war negativ (nicht abgebildet).

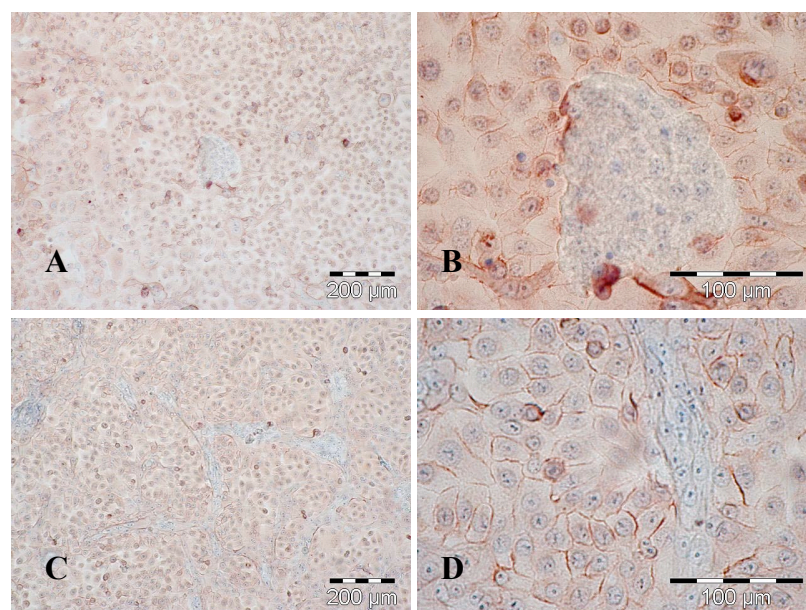


Abb. 19: Immunhistochemische Färbung von hREC-Kulturen mit dem AK CD44v6; A Übersicht P0; B Ausschnitt P0; C Übersicht P1; D Ausschnitt P1

Der CD49f Basalzellmarker wurde zunächst an Gewebeschnitten der Nasenmuschel getestet. Die Färbung zeigte eine deutlich rötlich-braun gefärbte Linie, die zwischen den Basalzellen und der Basalmembran verlief. Dabei handelte es sich um angefärbte Intergrine, die spezifisch mit dem CD49f AK reagierten (Abb. 20A). Ein gleichzeitig mit dem Maus IgG1 Antikörper gefärbter Gewebeschnitt (Negativkontrolle) zeigte keine Färbung (Abb. 20B).

Da sich im Gewebeschnitt keine anderen Zellen angefärbt hatten, wird der CD 49f AK als spezifisch erachtet und ist für die Markierung von Basalzellen aus dem humanen respiratorischen Epithel geeignet.

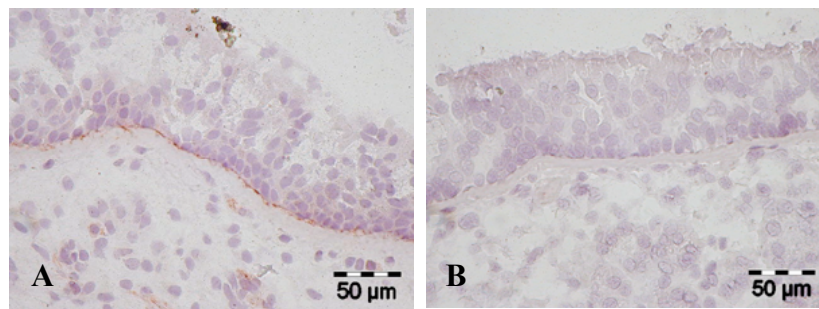


Abb. 20: **A** Färbung des humanen respiratorischen Epithels der Nasenmuschel mit dem CD49f Antikörper. **B** Negativkontrolle

Auch der Antikörper CD104 wurde an nativen Gewebeschnitten der Nasenmuschel auf seine Spezifität hin überprüft. Dieser Antikörper färbte, ähnlich dem AK CD49f, die Bindungsstellen zwischen Basalzellen und Basalmembran rötlich braun an (Abb. 21A). Die Negativkontrolle zeigte keine Färbung des Gewebes (Abb. 21B).

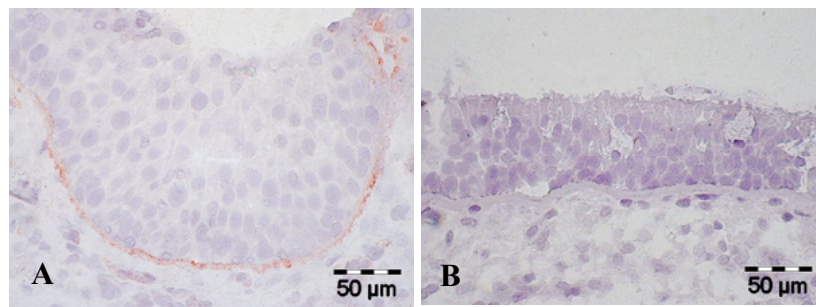


Abb. 21: **A** Färbung des humanen respiratorischen Gewebes der Nasenmuschel mit dem CD104 Antikörper. **B** Negativkontrolle

4.4 Differenzierung und Charakterisierung von humanen respiratorischen Epithelzellen im Air Liquid Interface

Das Differenzierungspotential der hREC wurde in der Air-Liquid-Interface Kultur (ALI) untersucht. Dazu wurden die hREC wie in Punkt 3.8 beschrieben auf Kollagenmembranen ausgesät. Da die Membranen transparent sind, konnten das Wachstum und die Morphologie der Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten der Kulturdauer mit dem Phasenkontrastmikroskop beurteilt werden.

Die ausgesäten hREC erreichten bereits nach ca. vier Tagen eine 100%ige Konfluenz (Abb. 22A), wobei auch in der ALI-Kultur die typische kopfsteinpflasterartige Morphologie zu erkennen war. Ab Tag 4 nach Konfluenz bildeten sich Multilayer aus (Abb. 22B und Abb. 22C), die am Tag 12 nach Konfluenz nahezu die gesamte Kultur überwuchsen (Abb. 22D). In der Betrachtung der ALI-Kulturen im Phasenkontrastmikroskop zeigte sich im Vergleich zu den Differenzierungskulturen in den Kulturflaschen, dass die hREC verstärkt Multilayer bildeten.

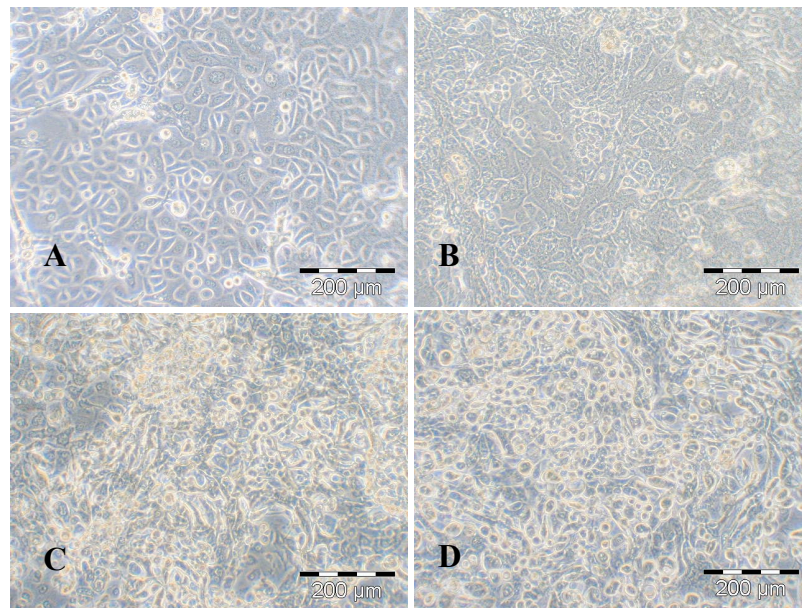


Abb. 22: hREC-Kultur P1 im Air-Liquid-Interface; **A** 100%ige Konfluenz Tag 0; **B** 4 Tage nach Konfluenz; **C** 8 Tage nach Konfluenz; **D** 12 Tage nach Konfluenz

Die im Air-Liquid-Interface kultivierten hREC färbten sich zum Zeitpunkt einer 100%igen Konfluenz (Tag 0) mehr als 50% mit dem Antikörper 34 β E12 und dem Antikörper CD44v6 rötlich braun an (Abb. 23A/24A), es handelte sich also um eine Kultur mit hoher Basalzeldichte. Die Negativkontrolle blieb ungefärbt (ohne Abbildung).

Wie bei den hREC-Kulturen in Zellkulturflaschen bildeten sich mit zunehmender Kulturdauer (Tag 4-12 nach Konfluenz) Multilayer aus. Basalzellen konnten nur noch in der Zellschicht beobachtet werden, die direkten Kontakt zur Kollagenmembran hatte (Abb. 23B-D/24B-D). Ein deutliches Zeichen für die Differenzierung der Basalzellen ist die Ausbildung von Zilien an der Oberseite von Zilienzellen. Diese waren im Elektronenmikroskop eindeutig nachweisbar.

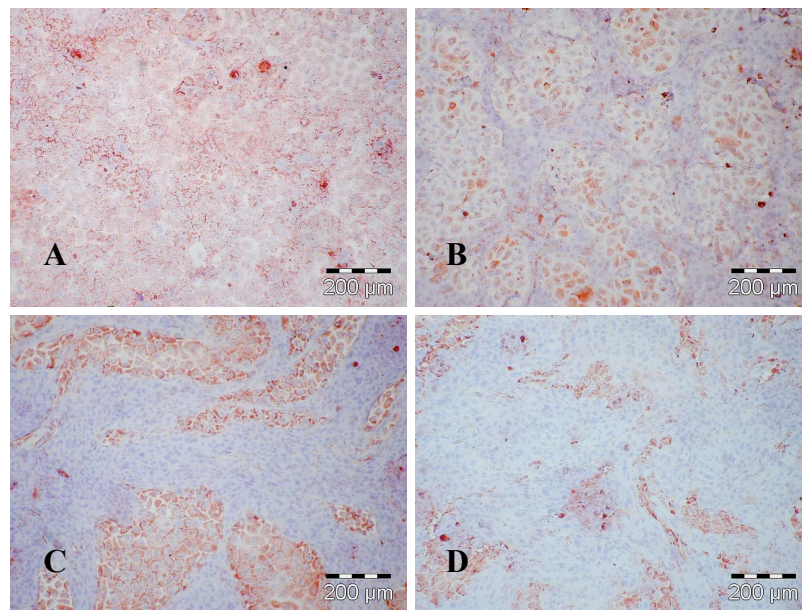


Abb. 23: Immunhistochemische Färbung der hREC im ALI mit dem 34βE12 AK **A** 100%ige Konfluenz (Tag 0); **B** 4 Tage nach Konfluenz; **C** 8 Tage nach Konfluenz; **D** 12 Tage nach Konfluenz

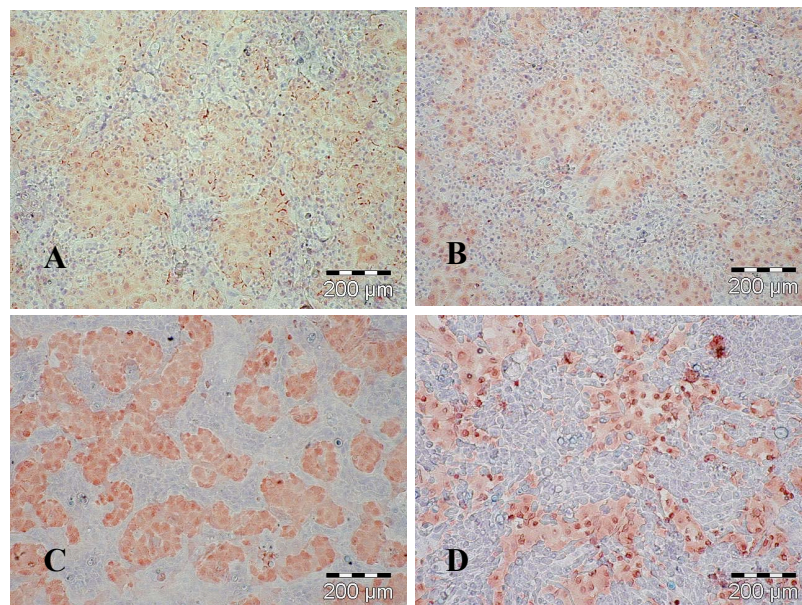


Abb. 24: Immunhistochemische Färbung von hREC mit dem AK CD44v6 im ALI; **A** 100%ige Konfluenz; **B** 4 Tage nach Konfluenz; **C** 8 Tage nach Konfluenz; **D** 12 Tage nach Konfluenz

4.5 Nachweis von Zilien im Rasterelektronenmikroskop

Zum Nachweis der Neubildung von Zilien bei der Kultivierung der hREC im ALI wurde die Rasterelektronenmikroskopie (REM) gewählt. Mit dieser Methode ist eine hohe Auflösung und damit verbunden eine starke Vergrößerung der darzustellenden Zilien möglich.

Zunächst wurde natives Nasenmuschel-Gewebe auf Zilien hin untersucht. Dabei konnten Zilien auf der Oberfläche des nativen respiratorischen Epithels der verwendeten Nasenmuscheln rasterelektronenmikroskopisch eindeutig dargestellt werden (Abb. 25A/B).

In der Abb.25A sind auch Erythrozyten zu sehen, die zwischen oder auf den hREC liegen. Da die Länge der Zilien nur ca. 5-12 μ m beträgt, der Durchmesser der Erythrozyten aber ca. 20 μ m, verdecken diese an einigen Stellen die Zilien. In Abb. 25B ist ein Zellareal mit dicht aneinander liegenden Flimmerzellen zu erkennen.

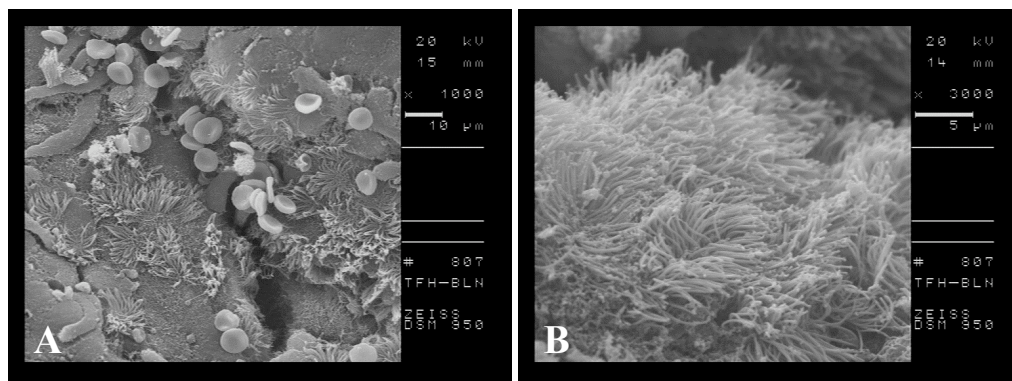


Abb. 25: REM-Aufnahmen von nativen Nasenmuscheln; **A** respiratorisches Epithel mit Flimmerzellen und Erythrozyten (Übersicht); **B** Oberfläche des Gewebes mit Zilien bedeckt

Die Auswertung der human respiratorischen Epithelzellen in ALI-Kulturen am Tag 0 (100% Konfluenz) ergab zunächst kein Wachstum von Zilien. Lediglich eine sehr raue Zelloberfläche mit Zellausläufern, die dem Zell-Zellkontakt dienen, konnten beobachtet werden (Abb. 26A). Am vierten Tag nach Konfluenz bildete sich ein Multilayer aus, in

dem vereinzelt Zellen zu erkennen waren, die Ansätze von Mikrovilli zeigten (Abb. 26B). Acht Tage nach Konfluenz konnten weder Mikrovilli noch Zilien beobachtet werden. Einige Zellen lagen kugelförmig vor (Abb. 26C).

Erst zwölf Tage nach Konfluenz zeigten sich zum ersten Mal Zilien (Abb. 26D), jedoch konnte diese Beobachtung nur vereinzelt gemacht werden. Ein Zellareal vergleichbar zu den Aufnahmen in Abbildung 25B konnte nicht beobachtet werden.

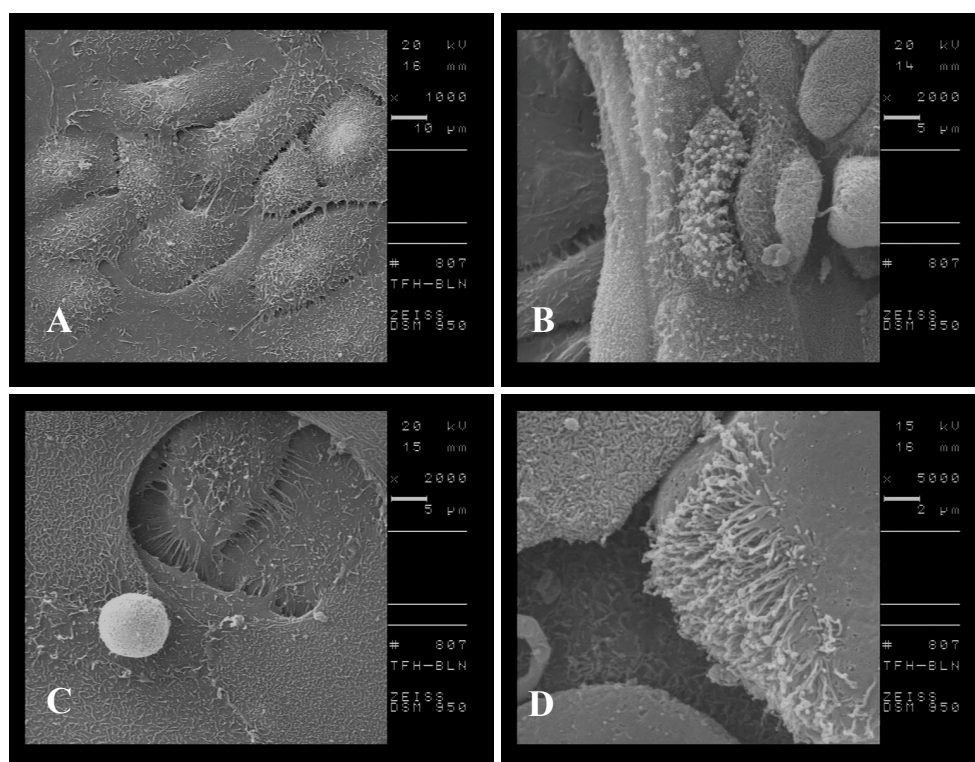


Abb. 26: REM- Aufnahmen von hREC (P1) im ALI; **A** 100% Konfluenz (d0) Zell-Zellkontakte, **B** 4 Tage Mikrovilli, **C** 8 Tage kugelförmige hREC, **D** 12 Tage Zilien

4.6 Genexpressionsanalysen

4.6.1 Auswahl und Design von Oligonukleotiden

Die Methode der real-time RT-PCR wurde im Rahmen dieser Arbeit in der Arbeitsgruppe am iCykler etabliert. Diese Methode wurde ausgewählt, um eine Änderung der

Expression bestimmter Gene über einen definierten Zeitraum semiquantitativ nachweisen zu können.

Für die Genexpressionsanalyse wurden vier Markergene ausgewählt, um deren Genexpression im Verlauf von Differenzierungskulturen der hREC in Zellkulturflaschen und von hREC Kulturen im ALI zu beschreiben. Für diese Markergene wurden Oligonukleotide mit Hilfe der Computerprogramme „PrimerSelect“ und „MegAlign“ erstellt. Die zugrunde liegenden humanen Gensequenzen wurden dem Internet entnommen [83]. Dabei wurden ausschließlich kodierende Gensequenzen verwendet. Die ermittelten Primer wurden anschliessend über den Internetdienst NCBI-BLAST [84] auf ihre Spezifität hin überprüft.

Weiterhin wurden folgende Kriterien verwendet:

- Annealing Temperatur (T_m) zwischen 55°C und 62°C
- Länge der Amplifikate zwischen 100bp und 250bp
- Lage der Amplifikate im 3' Bereich der Gene
- Länge der Primer zwischen 17bp und 24bp
- Keine Dimerbildung der Primer und keine internen Faltungen

Im Fall des Primers für Zytokeratin 14 (CK14) konnten die Vorgaben nicht eingehalten werden. Die Produktgröße beträgt 407bp. Zugunsten einer höheren Spezifität des Primers, musste der Kompromiss zum größeren Produkt eingegangen werden.

Zunächst wurde über Verdünnungsreihen die Effektivität der Primer bestimmt. Eine optimale PCR Reaktion führt in jedem Zyklus zu einer Verdoppelung der DNA-Moleküle. Die Effektivität dieser optimalen PCR ist größtenteils von der Primereffektivität abhängig, so dass bei der Primerauswahl darauf geachtet wurde, dass die Effektivität ähnlich der optimalen Effektivität von 2 lag.

4.6.2 Quantifizierung und Reinheitsbestimmung der Gesamt-RNA und cDNA Synthese

Aus den humanen respiratorischen Zellen konnte die Gesamt-RNA isoliert werden. Die

Überprüfung der Reinheit und Konzentration der RNA wurde über photometrische Messungen im Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren (260nm) und Proteine (280nm) durchgeführt. Der OD-Wert (optische Dichte) bei 260nm wurde zur Quantifizierung herangezogen, unter der Annahme, dass eine Absorption von eins einer Menge von 40µg/ml einzelsträngiger RNA entspricht. Die Absorption der Probenverdünnung lag hierbei im linearen Messbereich des Photometers. Als Nullwert wurde das Lösungsmittel (DEPC-Wasser) verwendet. Zur cDNA Synthese wurden nur Proben einbezogen, deren Menge an Gesamt-RNA 5µg nicht unterschritt. Aus dem Verhältnis der OD-Werte von 260nm zu 280nm wurde die Reinheit der RNA (Verunreinigung mit Proteinen) bestimmt. Hochreine RNA besitzt ein OD-Verhältnis von zwei. Die zur cDNA Synthese eingesetzten Proben wiesen alle ein OD-Verhältnis größer 1,4 auf.

Wie in 3.12 beschrieben wurde die cDNA Synthese durchgeführt, wobei die in der Gesamt-RNA enthaltene mRNA durch die Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben wurde. Die so erhaltene cDNA wurde anschließend bei –20°C gelagert.

4.6.3 Real time RT-PCR Analysen

Um von allen Proben die gleiche Ausgangsmenge an cDNA für die PCR einsetzen zu können, wurde über die ΔC_T -Werte ein Abgleich aller Proben mit dem Haushaltsgen GAPDH durchgeführt. Die Expression von GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase) der abgeglichenen Proben wurde definitionsgemäß gleich eins gesetzt.

Zur Berechnung der relativen Genexpression wurde folgende Formel angewendet:

$$FC = 2^{-\Delta\Delta C_T} \quad (\text{Gl.1})$$

$\Delta\Delta C_T$: Differenz der Thresholdzyklen zwischen Probe und Referenz

FC: relative Genexpression (fold change)

Wobei $\Delta\Delta C_T$ definiert ist als:

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ Probe} - \Delta C_T \text{ Referenz} \quad (\text{Gl.2})$$

C_T : Thresholdzyklus

$$\Delta C_T \text{ Probe} = [C_T (\text{Probe}) - C_T \text{ GAPDH} (\text{Probe})] \quad (\text{Gl.3})$$

$$\Delta C_T \text{ Referenz} = [C_T (\text{Referenz}) + C_T \text{ GAPDH} (\text{Referenz})] \quad (\text{Gl.4})$$

Die Referenz kann dabei jede beliebige Bezugsprobe sein, die definitionsgemäß eine relative Genexpression von eins erhält.

Mit den abgeglichenen Proben wurde die PCR für die Differenzierungskulturen in Zellkulturflaschen sowie für Differenzierungskulturen im ALI mit den spezifischen Primern für CK5 (Zytokeratin 5), CK13 (Zytokeratin 13), CK14 (Zytokeratin 14) und CK18 (Zytokeratin 18) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte über den erläuterten Weg, der von Winer 1999 publiziert wurde [74].

4.6.4 hREC Differenzierungskulturen im Monolayer

Die molekularbiologische Untersuchung auf RNA Ebene wurde mit einzelnen Proben von 6 Patienten (44,5 Jahre im Durchschnitt; 5 männlich; 1 weiblich; 4 Nichtallergiker; 2 Allergiker; alle Nichtraucher) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden in einem weiteren Schritt gemittelt und als Box-Whisker-Plot dargestellt. Alle im weiteren Verlauf beschriebenen Werte beziehen sich auf den Tag 0 und auf die Expression des Haushaltsgens GAPDH. Somit ergibt sich für den Tag 0 der Wert 1.

Der Basalzellmarker CK5 zeigte einen Anstieg in der Expression um das 2-fache am Tag 4 (Abb. 27A). Nach dem Tag 4 nimmt die Expression tendenziell bis zum Tag 12 ab. Die Expression von CK5 bei 70% Konfluenz der Zellen ist in etwa vergleichbar mit dem Tag

0, der wie beschrieben 100% Konfluenz der Zellen darstellt.

CK13, ein Marker des Plattenepithels, zeigt dagegen eine Abnahme der Genexpression vom Zeitpunkt der 70%igen Konfluenz bis zum Tag 4 (Abb. 27B). Nach Tag 4 nahm jedoch die Genexpression bis einschließlich Tag 12 deutlich zu.

CK14, auch ein Basalzellmarker, zeigte einen ähnlichen Verlauf, wie CK5 (Abb. 27C). Auch hier war ein Anstieg der Genexpression von Tag 0 zu Tag 4 erkennbar. Von Tag 4 zu Tag 12 nach Konfluenz der Zellen nahm die Genexpression tendenziell ab. Der Wert für 70% Konfluenz lag im Bereich der Expression am Tag 0.

Cytokeratin 18 (CK18), ein epithelialer Marker der frühen Embryonalphase, zeigte nur eine geringe Expression bei 70% und 100% Konfluenz der Zellen (Abb. 27D). Ab Tag 4 stieg dieser Wert jedoch um das 10-fache an und gipfelte am Tag 8, wobei eine 20fach erhöhte Expression im Vergleich zu GAPDH zu verzeichnen war.

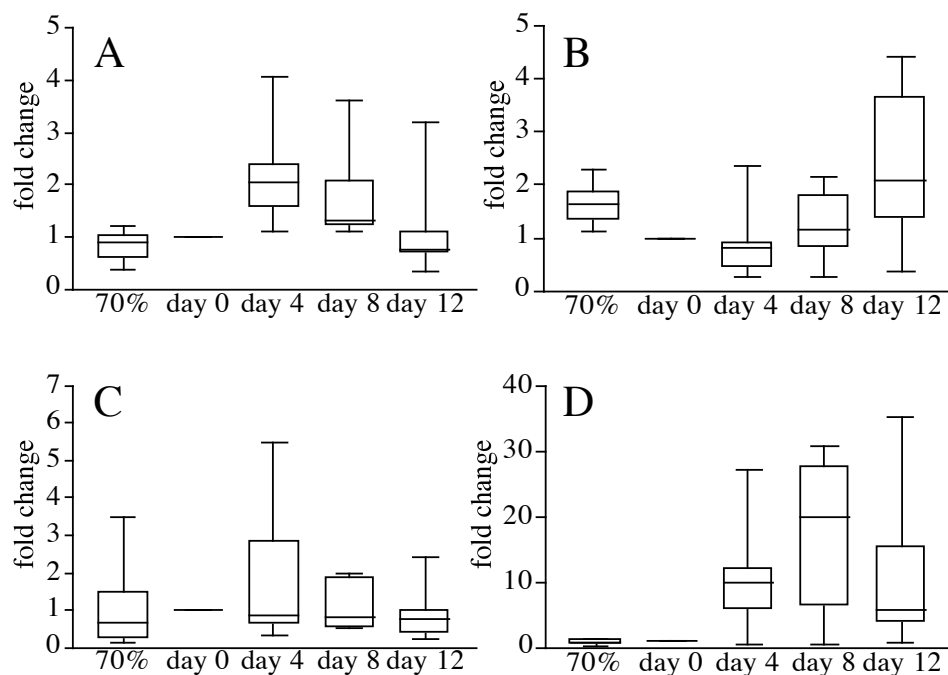


Abb. 27: Differenzierungskultur; Darstellung der relativen Genexpression als Vielfaches von GAPDH (fold change) über die Kulturdauer in Tagen (day) als Box-Wisker-Plot; **A** CK5; **B** CK13; **C** CK14; **D** CK18

4.6.5 REC Differenzierungskulturen im Air-Liquid-Interface

Die molekularbiologische Untersuchung auf RNA Ebene wurde mit einzelnen Proben von 6 Patienten (39,5 Jahre im Durchschnitt; männlich; Nichtallergiker; 5 Nichtraucher; 1 Raucher) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden in einem weiteren Schritt gemittelt und ebenfalls als Box-Whisker-Plot dargestellt. Auch hier beziehen sich alle im weiteren Verlauf beschriebenen Werte auf die Expression des Haushaltgens GAPDH.

Die Expression von CK5 war über den Kulturzeitraum von 12 Tagen im ALI relativ konstant (Abb. 28A). Lediglich kleinere Abweichungen waren zu erkennen, die jedoch wegen der großen Fehlerbalken nicht interpretiert werden konnten.

Die hREC im ALI zeigten einen 5-10fachen Anstieg der Expression von CK13 von Tag 0 bis Tag 8 (Abb. 28B). Von Tag 8 zu Tag 12 nahm die Expression von CK13 leicht ab.

CK 14 zeigte wiederum kaum Unterschiede in der Genexpression. Lediglich von Tag 4 zu Tag 8 konnte man einen tendenziellen Anstieg der Expression von CK14 erkennen (Abb. 28C).

Die Expression von CK18 stieg von Tag 0 bis Tag 8 auf das 2,5Fache an, fiel jedoch von Tag 8 zu Tag 12 wieder auf ungefähr den Ausgangswert am Tag 0 ab (Abb. 28D).

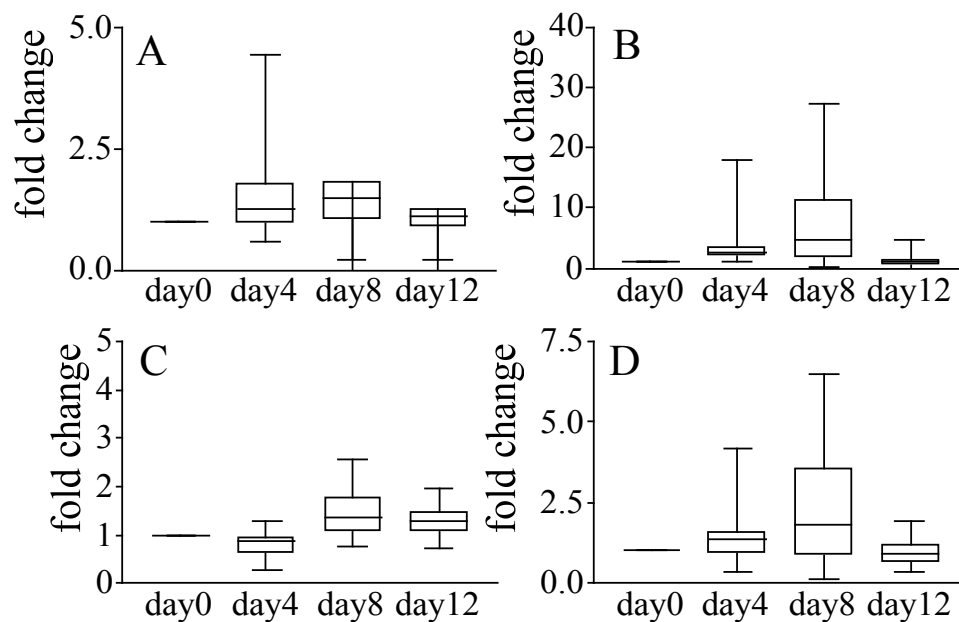


Abb. 28: Differenzierungskultur im ALI; Darstellung der relativen Genexpression als Vielfaches von GAPDH (fold change) über der Kulturdauer in Tagen (day) als Box-Wisker-Plot; **A** CK5; **B** CK13; **C** CK14; **D** CK18

4.7 Co-Kulturen

4.7.1 Co-Kulturen aus Epithelzellen und *in vitro* hergestellten Hochdichte-Chondrozytenpellets

Die Hochdichte-Kulturen bestehend aus humanen Nasenseptum-Chondrozyten wurden nach sieben Tagen im Differenzierungsmedium qualitativ auf ihren Matrixgehalt untersucht. In beiden Pelletkulturen (mit und ohne TGF- β 1) konnte Proteoglykanen deutlich nachgewiesen werden (Abb. 29A/B). Die Menge an gebildeten Proteoglykan ist in den TGF- β 1 supplementierten Knorpelpellets etwas höher als in den nicht supplementierten Pellets.

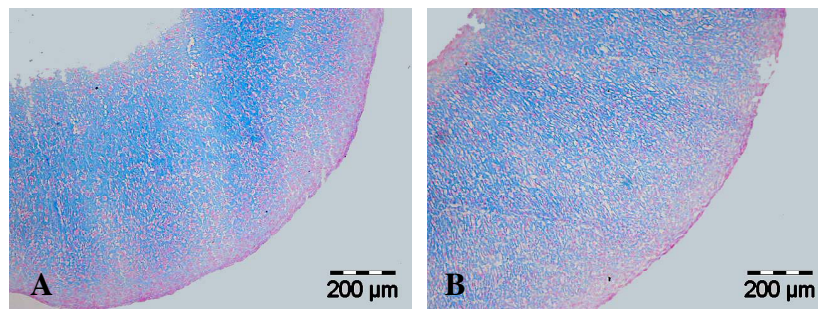


Abb. 29: Alcian-Blau-Färbung von humanen Chondrozytenpellets nach 7 Tagen Differenzierungskultur. **A** mit TGF- β 1, **B** ohne TGF- β 1

Nach 21 Tagen der Chondrozytendifferenzierung in Hochdichte-Pelletkulturen wurden humane respiratorische Epithelzellen auf die Oberfläche der Pellets gesät und in AECG-Medium bzw. konditioniertem Medium für 7 und 14 Tage kultiviert. Die Wahl des Mediums zeigte bei diesem Versuch keine Auswirkung auf das Adhäsionsverhalten, die Epithelschichtdicke oder das Differenzierungsverhalten. Nach sieben Tagen konnte bei beiden Versuchsgruppen eine dünne Epithelzellschicht mit dem AK CD44v6 bzw. 34 β E12 angefärbt werden, wobei es sich nicht um eine zusammenhängende Schicht handelte (Abb. 30A-C). Große Teile der Pellets wurden nicht besiedelt. Die Kultivierung der Pellets über 14 Tage zeigte keine Veränderungen. Auch hier konnte eine dünne Epithelschicht auf den Pellets beobachtet werden (Abb. 30D). Die Epithelschicht breitete sich nicht über die gesamten Pelletoberfläche aus. Allgemein nahm jedoch über den Zeitraum der Kultivierung der hREC/Knorpelpelletkonstrukte die Proteoglykanmenge in der Chondrozytenmatrix leicht ab.

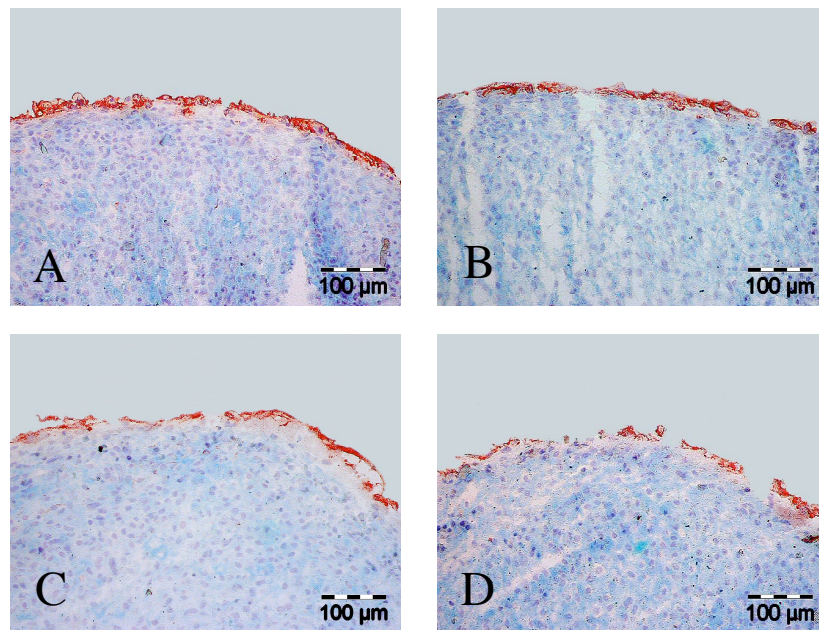


Abb. 30: Humane Chondrozytenpellets mit hREC besiedelt. **A** 7 Tage in AECG-Medium 34βE12 gefärbt, **B** 7 Tage in AECG-Medium, CD44v6 gefärbt, **C** 7 Tage in konditioniertem Medium, 34βE12 gefärbt, **D** 14 Tage in konditioniertem Medium, 34βE12 gefärbt. Gegenfärbung Alcian-Blau

4.7.2 Co-Kulturen aus Epithelzellen und nativen humanem Gelenkknorpel

Die ausgesäten humanen respiratorischen Epithelzellen adhärten auf den nativen Gelenkknorpelchips. Sie bildeten einen dünnen Multilayer, der fest mit der Knorpelmatrix verbunden war, wobei zwischen Tag 7 und Tag 14 der Kultivierung kein Unterschied in der Dicke der Zellschicht zu erkennen war. Bedingt durch die hohe Zahl an ausgesäten Epithelzellen, konnte sich schnell ein Multilayer bilden. Eine Zunahme der Schichtdicke durch Proliferation konnte über den Kultivierungszeitraum nicht beobachtet werden (Abb. 31 A-D)

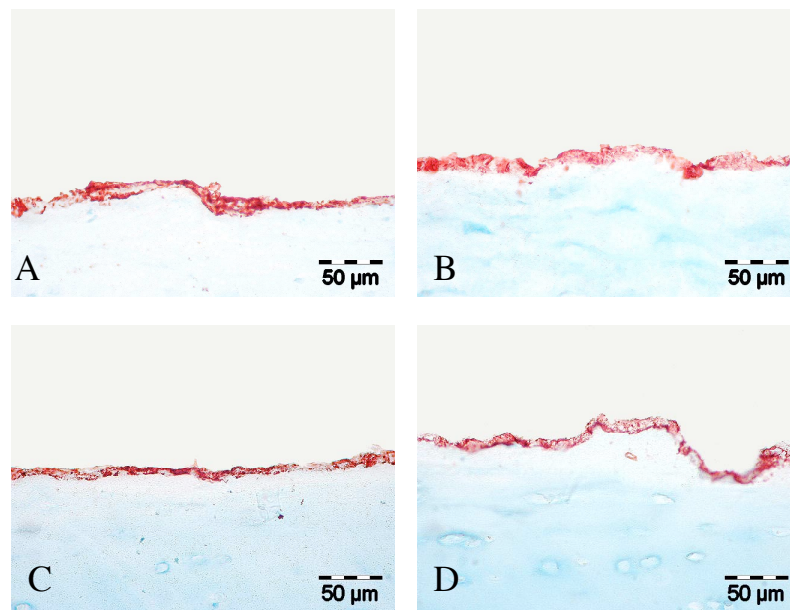


Abb. 31: Immunhistochemische Färbung von humanen respiratorischen Epithelzellen auf nativem Knorpelchips. **A** 34βE12 AK Tag 7; **B** CD44v6 AK Tag 7; **C** 34βE12 AK Tag 14; **D** CD44v6 AK Tag 14

Da die immunhistochemische Färbung nur einen Hinweis auf die Existenz von Basalzellen bzw. Becherzellen gibt, wurde am Tag 14 die Oberfläche der Epithelzellschicht zusätzlich am Rasterelektronenmikroskop auf Ziliogenese untersucht.

Auf der Oberfläche des mit Epithelzellen besiedelten Knorpelchips zeigte sich ein dichter Zellrasen mit einer kopfsteinpflasterartigen Struktur (Abb. 32B), wobei zusätzlich eine Multilayerbildung beobachtet werden konnte. In einigen Arealen traten vermehrt kugelförmige, nicht adhärenente Zellen auf, die außerdem unterschiedliche Oberflächenstrukturen und Größen aufwiesen (Abb. 32A). Bei den Oberflächenstrukturen handelte es sich neben sehr glatten, mit einzelnen Poren durchsetzten Formen, um besonders häufig auftretende, feine lamellenartige Strukturen (Abb. 31C/D). Die abgekugelten Zellen befanden sich immer auf einer adhärenenten Zellschicht, zellfreie Areale traten nicht auf. Zilien konnten in keiner Probe nachgewiesen werden.

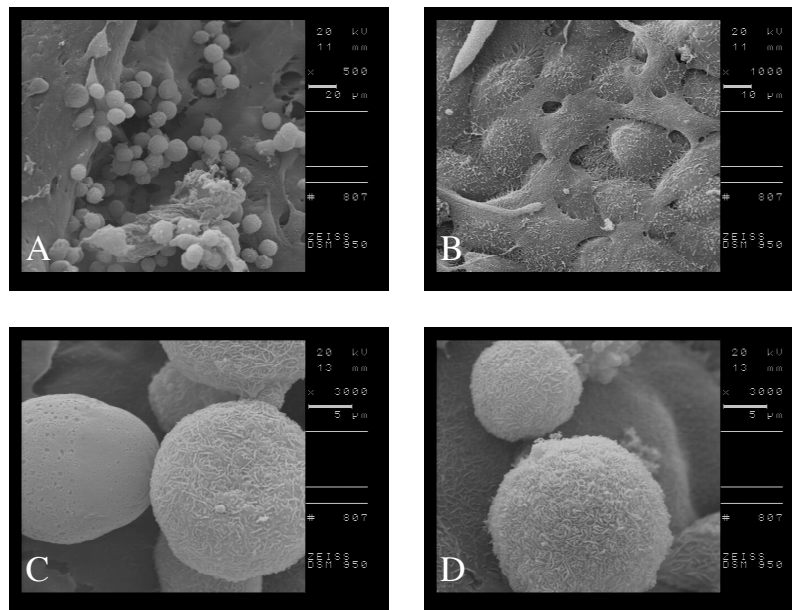


Abb. 32: REM- Aufnahmen von Knorpelchips besiedelt mit humanen respiratorischen Epithelzellen Tag 14. **A** Übersicht mit abgekugelten Zellen, **B** Multilayerwachstum; **C/D** Zellen mit glatter und lamellenartiger Oberfläche

4.7.3 Co-Kultivierung von respiratorischen Epithelzellen und humanen Knorpelzellen im Air-Liquid-Interface

Die durch enzymatischen Verdau gewonnenen humanen Gelenkchondrozyten zeigten eine für sie typische fibroblastenartige Morphologie und ein netzartiges Wachstumsmuster in Monolayerkulturen, die bereits in zahlreichen Arbeiten und Veröffentlichungen unserer Arbeitsgruppe beschrieben worden sind [85]. Im Gegensatz zu den hREC erfolgte die erste Passage bei einer nahezu 100%igen Konfluenz.

Die humanen Chondrozyten wurden in einer Zelldichte von 5×10^4 Zellen/cm² auf die Unterseite der Kollagenmembran gesät und in RPMI Kulturmedium bis zur Konfluenz (nach ca. 24h) kultiviert. Anschließend wurden 5×10^6 respiratorische Epithelzellen pro cm² auf der Kollagenmembran ausgesät. Das Medium wurde zu diesem Zeitpunkt durch AECG-Medium ersetzt und die Co-Kulturen bis zur Konfluenz der respiratorischen Epithelzellen (nach ca. 24h) kultiviert. Dabei zeigten beide Zellarten die für sie typische Morphologie (Chondrozyten fibroblastoid, Epithelzellen kopfsteinplasterartig).

Die weitere Kultivierung erfolgte in zwei unterschiedlichen Kultursystemen: in einer Immersionskultur und in einer Air Liquid Interface Kultur. Nach acht Tagen in Kultur wurden beide Systeme hinsichtlich Proliferations- und Differenzierungsverhalten der respiratorischen Epithelzellen miteinander verglichen.

4.7.3.1 Immersionskultur

In diesem Kultursystem wurden sowohl die Zellen auf der Unterseite der Kollagenmembran (Chondrozyten), als auch die Zellen auf der Kollagenmembran (hREC) über eine Kulturdauer von acht Tagen mit dem AECG-Medium versorgt.

Im Vergleich zu Tag 0 zeigten die hREC im Phasenkontrastmikroskop am Tag 4 eine höhere Zelldichte, vereinzelt konnte die Bildung von Bilayern beobachtet werden (Abbildung nicht gezeigt). Nach 8 Tagen konnte bei den hREC im Phasenkontrastmikroskop ein nahezu komplettes Multilayerwachstum (Abbildung nicht gezeigt) mit irregulärem Wachstum an der Oberfläche beobachtet werden, das durch Anfärbung mit den Antikörpern 34ßE12 und CD44v6 bestätigt wurde (Abb. 33A/B). Unterschiede in den beiden verwendeten AK-Färbungen konnten nicht beobachtet werden. Die Chondrozyten auf der Unterseite zeigten eine starke Proliferation bis zur Konfluenz, stellten aber ihre Proliferation nach Erreichen der Konfluenz ein und hafteten als Monolayer an der Membran.

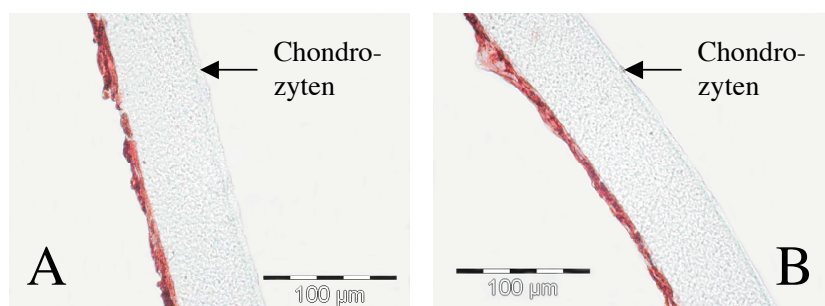


Abb. 33: Immersionskultur von hREC und humanen Chondrozyten auf einer Kollagenmembran, **A** hREC mit 34ßE12 gefärbt, **B** hREC mit CD44v6 gefärbt

4.7.3.2 *Air-Liquid Interface Kulturen*

Im Unterschied zu der Immersionskultur wurden nur die an der Unterseite wachsenden Chondrozyten in der Air-Liquid-Interface-Kultur mit AECG- Medium versorgt.

Oberhalb der hREC bildete sich deshalb eine Gasphase, die aus der Umgebungsluft bestand. Mit diesem ALI System sollte der Einfluss von flüssiger und gasförmiger Phase auf die Entwicklung der hREC untersucht werden.

Es zeigte sich, dass in dem beschriebenen System die Ausbildung eines Bilayers bzw. Multilayers schon deutlich ab Tag 4 zu erkennen war. Am Tag 8 konnte der Multilayer noch verstärkt beobachten werden (keine Abbildung). Auch die positiven immunhistochemischen Färbungen mit den Antikörpern 34ßE12 und CD44v6 nach 8 Tagen Kultudauer im ALI, waren die Bestätigung für einen Multilayer mit irregulärer Oberfläche. Hier ist ebenfalls kein Unterschied in den beiden verwendeten Antikörperfärbungen zu erkennen (Abb. 34 A/B).

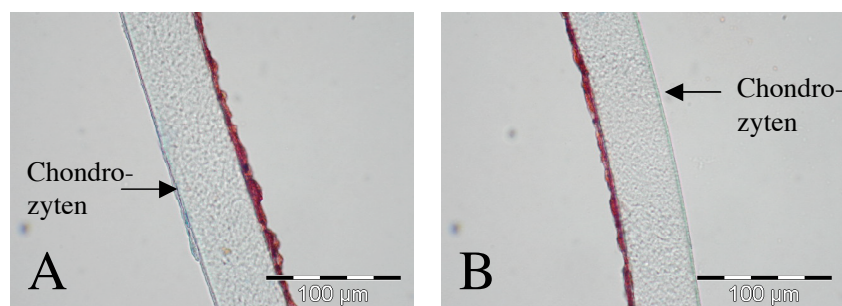


Abb. 34: Air-Liquid-Interface Kultur von hREC und humanen Chondrozyten auf einer Kollagenmembran Tag 8. **A** hREC mit 34ßE12 gefärbt, **B** hREC mit CD44v6 gefärbt

4.7.3.3 *Immersions- und Air-Liquid Interface Kultur unter Verwendung von konditioniertem Medium*

Im Gegensatz zu den zuvor aufgezeigten Versuchen wurde das AECG-Medium durch ein Gemisch aus konditioniertem Medium und AECG-Medium im Verhältnis 1:1 (v/v) ersetzt. Es handelte sich bei dem konditionierten Medium um RPMI Medium, das nach

48h Inkubation einer humanen Fibroblastenkultur entnommen wurde.

Die Co-Kultivierung von hREC und von Chondrozyten in der Immersionskultur auf der Kollagenmembran ergab einen dichten konfluenten Epitelzellrasen. Die Morphologie der hREC änderte sich über den Beobachtungszeitraum von zwölf Tagen nicht (Abb. 35A-F). Im Gegensatz zu der Immersionskultur zeigten die hREC im Air-Liquid-Interface, d.h. wenn sie der Umgebungsluft ausgesetzt waren, nach zwölf Tagen ein Anwachsen der Zellschichten bis hin zur Multilayerbildung. Die immunhistochemische Färbung der Co-Kulturen nach 4, 8 und 12 Tagen mit den Antikörpern 34 β E12 und CD44v6 zeigten deutlich den Zuwachs an Zellschichten auf der Kollagenmembran, dagegen waren die Chondrozyten als einschichtiger konfluenter Layer an der Unterseite der Membran zu erkennen.

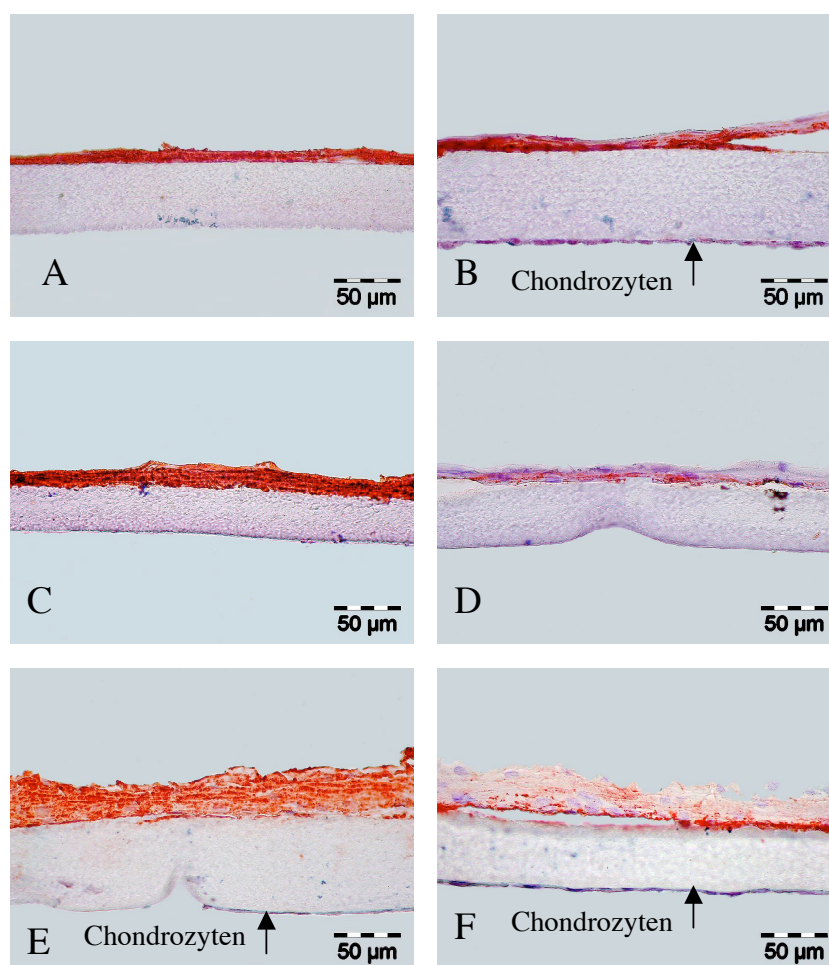


Abb. 35: Air-Liquid-Interface Kultur von hREC und humanen Chondrozyten auf einer Kollagenmembran mit konditioniertem Medium; mit 34βE12 gefärbt: **A** Tag 4, **C** Tag 8, **E** Tag 12; mit CD44v6 gefärbt: **B** Tag 4, **D** Tag 8, **F** Tag 12.

Eine Anfärbung einzelner Zellen bzw. einzelner Layer mit dem basalzellspezifischen Antikörper CD44v6 konnte nur an einem schmalen Streifen auf der Membran beobachtet werden. Am Tag 8 erschien die oberste Zellschicht farblos bis bläulich (Hämatoxylin), was am Tag 12 ebenfalls zu erkennen war. Dies könnte ein Hinweis auf eine Differenzierung der auf der oberen Schicht wachsenden, der Gasphase zugewandten hREC sein.

Ein unerwünschtes Phänomen zeigte sich bei den Co-Kulturen bei zunehmender Kulturdauer. Die Chondrozytenschicht lösten sich bei der Prozedur der

Kryokonservierung leicht von der Kollagenmembran ab. Daher sind in einigen Abbildungen, die Chondrozyten nicht mehr vorhanden (Abb. 35A/C/D). Auch die Epithelschicht löste sich in einigen wenigen Fällen durch die Prozedur des Kryokonservierens von der Kollagenmembran ab (Abb. 35B/F).

Um die Oberflächenbeschaffenheit der Epithelzellen im Air-Liquid-Interface zu analysieren, wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von den mit konditioniertem Medium ernährten Kulturen am Tag 12 hergestellt.

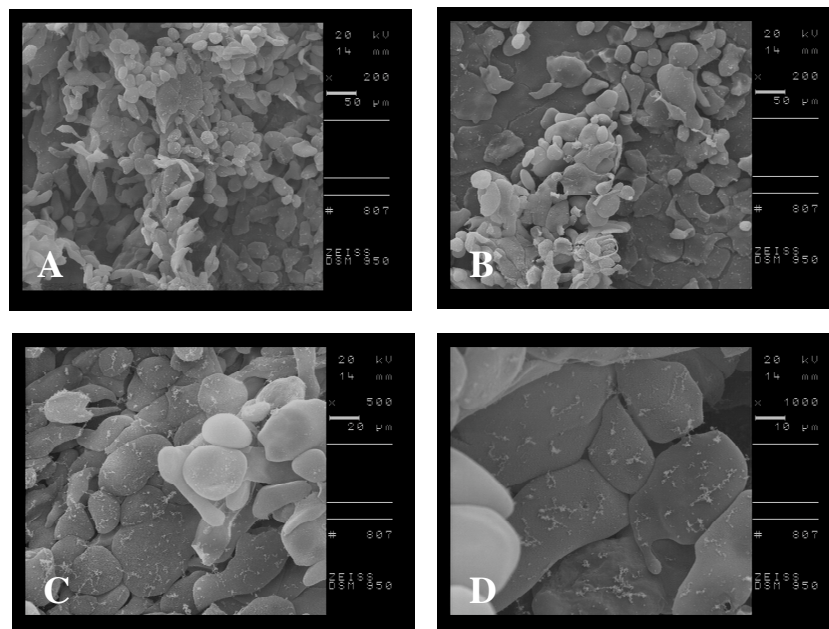


Abb. 36: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von hREC auf Kollagenmembranen kultiviert mit konditioniertem Medium
Tag 12

Die hREC Kultur zeigte auch hier eindeutig einen Multilayer, wobei die Zellen nahe der Kollagenmembran als dicht aneinander liegende, adhärente Zellen mit der typischen „pflastersteinartigen“ Morphologie zu erkennen waren (Abb. 36 C/D). Die oberen Zellschichten dagegen lagen in einem lockeren Zellverbund vor, der aus nahezu rundlich geformten Zellen bestand (Abb. 36 A-C). Eine Zilienbildung, die auf eine Differenzierung der Zellen zu Zilienzellen hinweisen würde, wurde nicht beobachtet.

5 Diskussion

Zwei Hauptgebiete in der Trachealforschung sind von besonderem Interesse: Die Trachealrekonstruktion und die Trachealfixation. Die Trachealrekonstruktion ermöglicht die Entfernung von Teilen der Trachea durch anschließendes Ersetzen von Trachealgewebe durch Implantations- oder Transplantationstechniken. Die bisher angewendeten Techniken, wie z.B. die Trachealanastomose sind jedoch limitiert durch die Größe des Defektes, der überbrückt werden muss [42, 86]. Obwohl in den letzten Jahren große Fortschritte auf dem Gebiet der Trachealrekonstruktion zu verzeichnen sind und neue Techniken wie z.B. Prothetik/Implantate oder autologe und allogene Transplantationen beschrieben wurden, erreichte keine Methode in größerem Umfang die klinischen Anwendung [16, 87, 88, 89, 90]. Das Tissue Engineering bietet hier neue Lösungsmöglichkeiten für die Rekonstruktion von trachealen Defekten. Trotzdem ist die Entwicklung von funktionellem Trachealgewebe aus den verschiedenen kultivierten Zelltypen immer noch eine Herausforderung [86]. Im Bereich der Trachealrekonstruktion stellt sowohl die Zusammensetzung des Gewebes aus vielen unterschiedlichen Zellarten, wie Knorpelzellen, Bindegewebszellen und respiratorischen Epithelzellen, als auch die Kombination und Anordnung dieser Gewebeteile zu einem funktionellen Organ eine große Herausforderung dar. Dies ist besonders gut im Bereich der Literatur zu beobachten. Die Forschergruppen, die sich mit der Problematik der Trachealrekonstruktion mittels Tissue Engineering beschäftigen, können grob in zwei Gruppen mit unterschiedlichen Herangehensweisen unterteilt werden: Die eine Gruppe beschäftigt sich überwiegend mit der Rekonstruktion des Knorpelgerüsts, das die Trachea stabilisiert [14, 39]. Zu diesem Zweck werden vermehrt *in vivo* Versuche an Hunden [91], Schweinen [92] und Schafen [93] durchgeführt, die über den Beobachtungszeitraum auch viel versprechende Ergebnisse zeigen. Der Funktionalität des respiratorischen Epithels wurde aber kaum Beachtung geschenkt.

Die andere Gruppe beschäftigt sich eher mit dem Aufbau, der Funktion und der Regeneration des respiratorischen Epithels, welches das Lumen der Trachea auskleidet [17, 23, 94], wobei es im Jahr 2004 gelungen ist, embryonalen Stammzellen der Maus in respiratorische Epithelzellen zu differenzieren [95].

Dieser Bereich gewinnt immer mehr an Bedeutung, da klar wird, dass Transplantate ohne respiratorisches Epithel nur eingeschränkte Funktionen übernehmen können und somit keine oder nur eine temporäre Verbesserung erreicht werden kann [96]. Die Kombination von funktionellen respiratorischen Epithelzellen und einem Knorpelstützgerüst stellt ein neues, scheinbar unüberwindbares Problem dar [97]. Dennoch zeigten einige Tierversuche viel versprechende Ergebnisse sowohl mit Gerüststrukturen aus Knorpel [15] als auch mit biokompatiblen Gerüststrukturen aus ePTFE (expandiertes Polytetrafluorethylen) [37]. Erfolg versprechende Studien im klinischen Bereich stehen jedoch noch aus.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst die Isolierung, Kultivierung, sowie die Charakterisierung von humanen respiratorischen Epithelzellen in der Arbeitsgruppe etabliert und die Zellen unter speziellen Kulturbedingungen *in vitro* differenziert werden. Anschließend sollten isolierte respiratorische Epithelzellen mit Knorpelzellen und Knorpelgeweben kombiniert und co-kultiviert werden.

Für diese Arbeit wurden humane Nasenmuscheln als Spendergewebe gewählt, da das auf den Nasenmuscheln befindliche respiratorische Epithel dem Epithel in der Trachea gleicht. Für die Isolation der Zellen aus dem Gewebeverband wurde das Enzym Dispase gewählt. Dieses Enzym wirkt im Vergleich zu Trypsin weniger aggressiv auf die Zellen, ist aber gleichzeitig effektiver als Collagenase oder andere proteolytisch wirkende Enzyme. Die Dispase spaltet Fibronectin, Kollagen IV und zu einem geringeren Anteil Kollagen I, welches die Hauptbestandteile der Basalmembran unterhalb des respiratorischen Epithels sind. [98].

Zur Optimierung der Adhäsion von respiratorischen Epithelzellen wurden Zellkulturflaschen mit Kollagen beschichtet. Die Kollagenbeschichtung simuliert *in vitro* die Basalmembran, die ebenfalls zu einem großen Teil aus Kollagen besteht und die Adhäsion der respiratorischen Epithelzellen begünstigt.

Es zeigte sich, dass humane respiratorische Epithelzellen auf ein Medium mit einem „Cocktail“ aus spezifischen Wachstumsfaktoren angewiesen sind. Jedoch führen diese mitogenen Stimuli beispielsweise bei anderen Zellarten zu einer Dedifferenzierung der Zellen *in vitro* [99]. Die humanen respiratorischen Epithelzellen ließen sich gut in der Monolayerkultur vermehren. Mögliche Kontaminationen durch Fibroblasten konnten in

Monolayerkulturen durch die deutlichen Morphologieunterschiede zwischen den respiratorischen Epithelzellen und den Fibroblasten durch Phasenkontrastmikroskopie überwacht und ausgeschlossen werden. Die typische „kopfsteinpflasterartige“ Form der respiratorischen Epithelzellen, die die Zellen nach ca. drei Tagen annahmen, wurde in der Literatur bereits beschrieben [17] und konnte in den beschriebenen Experimenten dieser Arbeit bis zur Passage 4 beobachtet werden, wobei in unseren Monolayerkulturen die Größe der einzelnen Zellen von Passage zu Passage zunahm. Typischerweise verloren die respiratorischen Epithelzellen in Monolayerkultur ihre Zilien, wie es bereits in der Literatur beschrieben wurde [79]. Verschiedene Ursachen für den Zilienverlust wie z.B. zu geringe initiale Aussaatdichten und ungenügende Supplementierung des Kulturmediums mit Wachstumsfaktoren, wie Vitamin A wurden bereits diskutiert [40, 100, 101]. Zusätzlich wurden die respiratorischen Epithelzellen durch enzymatischen Verdau von der Basalmembran abgelöst, die wahrscheinlich einen regulatorischen Effekt auf die Differenzierung von Epithelzellen besitzt [102]. Ein Lösungsansatz wäre die Kultivierung von kleinen Gewebestücken aus dem respiratorischen Epithel [17], wobei zunächst Fibroblasten auswandern und Zilienzellen sich auf dieser Fibroblastenschicht vermehren. Allerdings ist die Zellausbeute in diesen Kulturen für spätere Tissue Engineering Anwendungen zu gering.

Naheliegender ist der Versuch, die Kultivierung im Monolayer, in der eine gute Proliferation beobachtet werden konnte, mit der Gewebekultur, die zur Differenzierung geeignet scheint, zu kombinieren. Hierfür bietet sich die Methode des Air-Liquid-Interface an, in der die physiologische Umgebung der respiratorischen Epithelzellen *in vitro* simuliert wurde [103]. Die Basalmembran wurde entweder durch eine Kollagenmembran oder einem Gemisch aus Kollagen und Fibronectin ersetzt, die zwei Kompartimente, die Gasphase (simuliert das Lumen) und die nährstoffreiche flüssige Phase voneinander trennt. Diese Kultivierungsmethode findet mittlerweile eine breite Anwendung z.B. für *in vitro* Toxizitätstests [104], Differenzierungsversuche an respiratorischen Epithelzellen [56] und Frequenzmessungen an Zilien [105].

Ein weiterer in der Literatur sehr kontrovers diskutierter Punkt ist die Frage nach den respiratorischen Vorläuferzellen. Neben dem traditionellen Verständnis, dass alle im respiratorischen Epithel vorhandenen Zellarten den Basalzellen (auch „Reserve-Zellen“

genannt) entstammen [22, 106], wird in einigen älteren Studien jedoch postuliert, dass im respiratorischen Epithel keine Vorläuferzellen existieren [107]. Im starken Kontrast zu der Vorläuferzell-Theorie steht demnach die Hypothese, dass sowohl Basalzellen als auch sekretorische Zellen im respiratorischen Epithel durch Dedifferenzierung und erneuter Redifferenzierung in der Lage sind, sich in unterschiedliche Zelltypen zu entwickeln [107]. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in der Literatur kein ausreichender Nachweis für Stammzellen im respiratorischen Trakt beschrieben ist, bzw. dass keine spezifischen Marker für Stammzellen im respiratorischen Epithel gefunden wurden [108]. Ferner zeigt die neuere Literatur, dass sich anscheinend doch die Basalzellen durch Differenzierung in alle drei Zellarten des respiratorischen Epithels entwickeln können [20, 109, 110]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher versucht, die Basalzellen als respiratorische Progenitorzellen im Epithel zu identifizieren und aus dem Epithelzellgemisch zu isolieren. Zur spezifischen Anfärbung von Basalzellen im nativen Gewebe wurden die Antikörper 34ßE12, CD44v6, CD49f und CD104 gewählt.

Die in der Literatur häufig beschriebenen und verwendeten Lectine [23, 24, 111] wurden in dieser Arbeit nicht verwendet, da es in der Literatur sehr widersprüchliche Angaben zur Bindungsspezifität gibt. Bals et al beschreiben eindeutig, dass die Bindung an eine oder mehrere Epithelzellarten blutgruppenabhängig ist [112]. Daher wurde in dieser Arbeit versucht, durch Antikörperfärbung Basalzellen zu identifizieren. Der in der Literatur als basalzellspezifisch und parabasalzellspezifisch beschriebene Marker 34ßE12 [65] zeigte in der Färbung von nativem Nasenmuschelgewebe jedoch eindeutig eine Anfärbung von Basal- und Becherzellen. Erst die Färbung von nativen Gewebeschnitten mit CD44v6 [113, 114], CD49f und CD104 [82] zeigte eine spezifische Bindung an Basalzellen. Da die Bindung von CD44v6 an die Basalzellen als schwach beschrieben wurde [113], erschien es sinnvoller für die FACS Methode, die Antikörper gegen CD49f und CD104 zu verwenden. Mittels dieser beiden Antikörper ist es gelungen, jeweils eine Zellpopulation zu identifizieren und durch das Sortieren von Zellgemischen CD104 positive Zellen aus primären respiratorischen Epithelzellen zu isolieren. Die Isolation der Basalzellen im FACS mit den Antikörpern CD104 und CD49f ist bisher nicht in der Literatur beschrieben. In der Literatur ist die Isolation von Basalzellen aus nasalen Polypen und Nasenmuscheln bisher mittels GSI-B₄ (Griffonia simplicifolia isolectin B₄) durchgeführt worden [25]. Die

Autoren zeigten, dass etwa 80% der Zellsuspension GSI-B₄ positiv waren. Eine immunhistochemische Färbung der isolierten Zellen mit verschiedenen Integrinen zeigte jedoch, dass nicht alle diese als Basalzellen bezeichneten Zellen gefärbt wurden. Die unterschiedlichen Färbeergebnisse wurden durch eine Heterogenität der Basalzellschicht erklärt. Desweiteren wurde beschrieben, dass diese Basalzellschicht neben Basalzellen auch aus so genannten Stamm- und Progenitorzellen besteht, sowie einer Subpopulation von Basalzellen, die Integrine stärker exprimieren. Diese Subpopulation spielt eine große Rolle bei der Bindung der Basalzellen an die Basalmembran. Obwohl keine Mengenangaben zu den gefärbten Zellen gemacht wurden, unterstützen diese Beobachtungen die Ergebnisse dieser Arbeit. Im Rahmen dieser Arbeit waren lediglich 8,8% der vitalen Zellen CD104 positiv (entspricht der $\beta 4$ -Kette des $\alpha 6\beta 4$ -Integrinrezeptors). Im Gegensatz zu der Arbeit von Hicks et al wurden zusätzlich unspezifische Bindungen durch die Verwendung des blutzellspezifischen Antikörpers Anti-Maus CD3 (bindet nicht an respiratorische Epithelzellen) ausgeschlossen und gleichzeitig eine Isotypenkontrolle durchgeführt. Zudem war der prozentuale Anteil der antikörpermarkierten und unmarkierten toten Zellen mit 18,3% relativ hoch. Sowohl die Färbeprozedur mit ihren Wasch- und Färbeschritten, als auch die Scherkräfte innerhalb der sehr dünnen Kapillaren des FACS Gerätes haben eine zellschädigende Wirkung auf die empfindlichen Zellen.

Es kann geschlussfolgert werden, dass nur ein geringer Anteil der Basalzellen des respiratorischen Epithels isoliert wurde, nämlich der Teil, der den Lamininrezeptor $\alpha 6\beta 4$ stark exprimiert. Das erklärt auch die starke Anfärbung der Zellen in den Monolayerkulturen. Im Verhältnis zu den durch die Zellsortierung isolierten Basalzellen, konnte man durch die Färbung mit CD44v6 im Monolayer von einer weitaus größeren Anzahl an Basalzellen in der Kultur bzw. in den primärisolierten Zellsuspension ausgehen, die sich durch die FACS Untersuchungen mit den AK CD104 und CD49f nicht bestätigte. Zur Überprüfung der Ergebnisse der Forschergruppe um Hicks hätte der Nachweis der Basalzellen mit GSI-B₄ erfolgen müssen. In unserem Laboratorium konnte jedoch eine spezifische Bindung des Lektins an Basalzellen in nativen respiratorischen Epithelgeweben nicht nachgewiesen werden (unveröffentlichte Daten aus der Arbeitsgruppe).

Zur Charakterisierung der respiratorischen Epithelzellen, insbesondere der Basalzellen in

der Monolayerkultur und im Air-Liquid-interface, konnte auch eine Genexpressionsanalyse von epithelspezifischen Zytokeratinen auf RNA-Ebene durchgeführt werden.

5.1 Molekularbiologische Charakterisierung der hREC

Die Genexpressionsanalysen der Differenzierungskulturen und der ALI-Kulturen mit dem Zytokeratinpaar CK5 und CK14, die als typische Marker für mitotisch aktive Basalzellen verschiedener mehrschichtiger Epithelien bekannt sind, zeigten, dass CK14 nahezu nicht reguliert wird. Lediglich am Tag 4 in der Differenzierungskultur konnte eine marginale Erhöhung festgestellt werden. CK5 dagegen wurde in der Differenzierungskultur bis Tag 4 induziert und zeigte danach bis Tag 12 eine Repression. In der ALI Kultur wurde das Zytokeratinpaar über den gesamten Beobachtungszeitraum von 12 Tagen nicht reguliert. Das Ergebnis deutet darauf hin, dass sich die Basalzellen sowohl in der Differenzierungskultur als auch in der ALI Kultur vermehren und einen Multilayer bilden.

Obwohl CK13 in Basalzellen des mehrreihigen nasalen Oberflächenepithels und in Epithelien mit Basalzellhyperplasie exprimiert wird, wird CK13 ebenfalls bei der Plattenepithel-Metaplasie exprimiert [67]. Die ansteigende Expression von CK13 in der Differenzierungskultur bis zum Tag 12 deutet auf eine Entwicklung zu einem Plattenepithel oder einer Basalzellhyperplasie hin. Im Gegensatz dazu zeigt die Expression von CK13 in ALI Kulturen ein Maximum am Tag 8 und eine Abnahme am Tag 12, die auf eine Differenzierung der Zellen zu kolumnaren Zellen hinweist [66]. Die Genexpression von CK18 zeigte einen gegenteiligen Verlauf in der Differenzierungskultur, wobei ein Anstieg um das ca. 30fache am Tag 8 verglichen mit Tag 0 zu sehen war, um am Tag 12 wieder abzufallen. Auch in der ALI Kultur zeigte sich ein Maximum am Tag 8. Jedoch nahm auch hier die Expression von CK18 am Tag 12 ab. CK18 wird von Jetten et al zusammen mit den Zytokeratinen 7, 8 und 19 als die am stärksten exprimierten Zytokeratine beschrieben [66].

Die Ergebnisse zeigen, dass sich die hREC in der Differenzierungskultur nicht ohne weiteres differenzieren lassen, sondern tendenziell zur Basalzellhyperplasie neigen. Dagegen zeigt das Expressionsmuster der hREC in der ALI-Kultur eine Differenzierung in

Richtung eines respiratorischen Epithels. Zilien konnten unter dem Elektronenmikroskop nur bei einer Probe an einer einzelnen Zelle beobachtet werden. Eine Alcianfärbung der ALI Kulturen war nicht möglich, da die Färbelösung die Membran schädigte, sodass keine Zellen mehr erkennbar waren.

5.2 Co-Kulturen

Eine Vielzahl von Co-Kultursystemen mit respiratorischen Epithelzellen werden in der Literatur beschrieben. Dabei handelt es sich jedoch häufig um Systeme zur Testung von toxischen Substanzen und ihre Wirkung auf Becher- und Zilienzellen. Die Co-Kulturen dienen der Simulation des nativen Gewebes *in vitro*. Sie können Aufschluss über Zell-Zellinteraktionen, Matrixproduktion und Differenzierung von Geweben geben. Die Co-Kulturen stellen einen wichtigen Schritt in Richtung Tiermodell dar.

In dieser Arbeit sollte unter anderem überprüft werden, ob es möglich ist, ein Transplantat bestehend aus einer Gerüst- oder Trägerstruktur und einem funktionellen respiratorischen Epithel herzustellen. Zunächst wurde ein relativ einfaches System gewählt, wobei humane Gelenkknorpelchips als Träger für kultivierte hREC fungieren sollten. Es ist bekannt, dass Epithelzellen bevorzugt auf einer extrazellulären Matrixunterlage adhärieren, wobei Kollagene den Hauptteil ausmachen [28]. Knorpel mit seiner kollagenreichen Matrix sollte die Basis für die hREC darstellen.

In diesem Versuch zeigte sich, dass es möglich ist, die hREC ohne Klebersubstanzen auf die Chips aufzubringen, wo sie anwuchsen und eine dünne Epithelschicht bildeten. Die histologischen und immunhistochemischen Färbungen konnten jedoch keinen Beweis für eine Differenzierung der Zellen liefern. Vielmehr färbten sich alle Zellen in der Epithelschicht mit dem basalzellspezifischen Antikörpern CD44v6 und 34ßE12 an.

In einer zweiten Co-Kultur sollten mittels Tissue Engineering hergestellte Knorpelpellets als Trägerstruktur dienen. Dazu wurden Hochdichte-Pelletkulturen aus isolierten humanen Chondrozyten aus Nasensepten hergestellt [115] und 21 Tage mit supplementiertem Medium kultiviert. Nach einer Woche konnte bereits die Matrixbildung durch Alcian-Blau-Färbung nachgewiesen werden. Durch die Besiedelung mit hREC und der

gleichzeitigen Umstellung der Co-Kulturen auf AECG-Medium nahm jedoch der Matrixgehalt in den Pellets ab, was durch erneute histologische Färbungen mit Alcian-Blau gezeigt wurde. Zudem löste sich häufig die hREC Zellschicht von den Pellets ab. Da Kollagene, wie schon erwähnt, für das Adhäsionsverhalten der hREC eine große Rolle spielen, kann die Abnahme der Matrixkomponenten im Pellet mit dem Ablösen der hREC Zellschicht in Verbindung gebracht werden.

In einem dritten Co-Kultursystem bestehend aus hREC und humanen nasalen Chondrozyten, die jeweils auf die Ober- oder Unterseite einer Kollagen IV-Membran ausgesät wurden, wurde konditioniertes Medium von einer Fibroblastenkultur (ebenfalls aus Nasenmuscheln gewonnen) verwendet. Goto et al konnte bereits 1999 zeigen, dass die Co-Kultivierung mit Fibroblasten durch den Einsatz von konditioniertem Fibroblasten-Medium ersetzt werden kann [116]. Bei dem Einsatz dieser speziellen Kollagenmembranen ist es möglich, die hREC auf der Oberseite der Membran mit Medium zu versorgen (Immersionkultur), oder aber das Medium oberhalb zu entfernen und die hREC der Luft zu exponieren (Air-Liquid Interface). Bei der Durchführung einer Immersionkultur induzierte das verwendete konditionierte Medium die Proliferation der hREC. Im Air-Liquid-Interface zeigten die Färbungen der Kryoschnitte, dass sich ein mehrschichtiges respiratorisches Epithel ausgebildet hatte, welches nicht nur, wie bei den anderen Co-Kultursystemen aus Basalzellen besteht, sondern auch durch die Alcian-Blau-Färbung gefärbte Zellen (blau weist auf Mukopolysaccharide hin) in der Epithelschicht zu erkennen waren, die somit als Becherzellen identifiziert werden konnten.

Die Co-Kulturversuche zeigten, dass nicht nur Wachstumsfaktoren, wie EGF für die Differenzierung allein verantwortlich sind, sondern auch Zell-Zell-Interaktionen, Zell-Matrix-Interaktionen, sowie die Umgebung der Zellen, in diesem Fall das Air-Liquid Interface, eine große Rolle bei der Differenzierung der respiratorischen Epithelzellen spielen. Obwohl es nur ansatzweise gelungen ist eine Ziliogenese zu induzieren und nachzuweisen, sind diese Co-Kulturen ein erster Schritt in Richtung Transplantatentwicklung. Aufbauend auf diese Ergebnisse könnte weiterführend die Ziliogenese durch Erhöhung der Retinolsäurekonzentration im konditionierten Medium induziert werden [117, 118].

5.3 Ausblick und Perspektiven

Das Tissue Engineering eröffnet neue Möglichkeiten zur Entwicklung von vitalen und funktionellen Transplantaten. Speziell im Bereich der Atemwege müssen jedoch noch viele grundlegende Probleme gelöst werden, bevor ein *in vitro* hergestelltes Gewebe die Anforderungen des klinischen Einsatzes erfüllt. Unter Funktionalität ist hier neben der Mukusproduktion, die weder übermäßig noch zu gering ausfallen sollte, auch die Ausbildung von Kinozilien gemeint. Diese sollen durch den simultanen Zilienschlag den Mukus und andere Partikel in Richtung Kopf transportieren. Nicht allein die Funktionalität des respiratorischen Epithels, sondern auch die biomechanische Belastbarkeit des gesamten Transplantats, stellt einen wichtigen Faktor dar. Sowohl die Längselastizität des Transplantats, als auch Beugebewegungen und Torsionsbewegungen müssen gewährleistet sein. Weiterhin muss die Formstabilität gesichert sein, ohne die es zur Einengung des Lumens oder sogar zum Kollabieren der Trachea kommen kann. Hier könnten mittelfristig *in vivo* Versuche am Tier weitere Erkenntnisse über den Einsatz kleinerer Transplantate (ca. 2x3cm) bestehend aus tissue engineerten Knorpelträgern in Kombination mit einer aufliegenden respiratorischen Epithelzellschicht liefern.

Da es möglich ist, End-zu-End-Anastomosen von bis zu vier Zentimetern Länge bei 90%iger Erfolgsquote [119] und Resektionen bis zur halben Länge der Trachea, etwa sechs Zentimeter, durchzuführen [41], stellt sich die Frage, ob ein bioartifizieller Gewebeersatz in absehbarer Zeit eine Alternative zu den bisherigen Methoden darstellen kann. Langfristig ist jedoch die Überbrückung von langstreckigen Trachealstenosen und großen Defekten z.B. nach Tumorsektion durch bioartifizielle Transplantate denkbar.

Operationsmethoden, bei denen Trachealprothesen dauerhaft verwendet werden, gelten bislang nicht als etabliert [41]. Es ist zwar gelungen solide oder auch poröse Prothesen zu entwickeln. Diese reizen jedoch durch die unzureichende oder gar fehlende Epithelisierung immer wieder das umgebende Gewebe, sodass es zur Bildung von Narbengewebe und Stenosen kommt [36, 37]. Hier bietet die Epithelisierung dieser Prothesen kurzfristig einen ernsthaften Lösungsansatz. Das respiratorische Epithel übernimmt hierbei eine doppelte Schutzwirkung: Zum Einen, indem sie das Risiko der exzessiven Bildung von Granulationsgewebe vermindert, zum Anderen bildet das Epithel einen effektiven

Infektionsschutz [37].

Die Forschungsergebnisse dieser Arbeit bilden prospektiv gesehen die erforderlichen Grundlagen, um einen autologen Trachealersatz *in vitro* zu konstruieren und diesen klinisch anzuwenden.

6 Zusammenfassung

In der rekonstruktiven Chirurgie ist ein wachsender Bedarf an Ersatzmaterialien zu verzeichnen, um Gewebedefekte zu füllen. Mit den Methoden des Tissue Engineering ist es heutzutage möglich, Defekte im Bereich der Haut, des Knorpels und auch des Knochens durch autologe, *in vitro* hergestellte Transplantate zu decken. Im Bereich der Luftwege wird überwiegend mit synthetischen Materialien z.B. Stents gearbeitet. Der Einsatz von synthetischen Materialien zur Deckung von langstreckigen Defekten scheiterte bisher, da sich häufig Granulationsgewebe bildete, was sich auf eine ungenügende Reepithelialisierung zurückführen lässt. Durch die Herstellung eines bioartifiziellen Konstruktes aus tissue engineerten Knorpel und respiratorischen Epithel oder auch nichtresorbierbaren Materialien, die mit respiratorischen Epithel ausgekleidet werden, eröffnen sich neue Möglichkeiten im Bereich des Trachealersatzes. Dazu wurden respiratorische Epithelzellen von Nasenmuscheln gewonnen und *in vitro* in Proliferations- und Differenzierungskulturen kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mittels histologischer und immunhistochemischer Methoden sowie semiquantitativer real-time RT-PCR auf spezielle Marker untersucht. Es zeigte sich, dass die respiratorischen Epithelzellen in den Proliferationskulturen dedifferenzieren und durch spezielle Basalzellmarker (CD44v6, CD104, CD49f) angefärbt werden konnten. Die Differenzierungskulturen und Air-Liquid-Interface-Kulturen gaben erste Hinweise auf die Differenzierung der Zellen, da durch den Vergleich der Färbung mit CD44v6 und 34ßE12 bestimmte Bereiche in den Kulturen nicht mit den Basalzellmarkern angefärbt wurden. Die Bildung von Zilien konnte mittels Rasterelektronenmikroskopie nur exemplarisch in Air-Liquid Interface Kulturen gezeigt werden.

Zusätzlich konnten Basalzellen im Durchflusszytometer unter Verwendung der Antikörpern CD49f und CD104 detektiert und analysiert werden. Zudem konnte die Population mittels FACS aus der Gesamtpopulation, bestehend aus Basal-Becher- und Zilienzellen, separiert werden.

In Co-Kulturversuchen, die als Prototypen für die Herstellung von Transplantaten für die Trachealrekonstruktion gelten, konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, respiratorische Epithelzellen sowohl auf humanem Knorpel als auch auf Kollagenmembranen über

12 Tage in Kultur zu halten. Die Besiedelung von tissue-engineerten Chondrozytenpellets mit respiratorischen Epithelzellen konnte bedingt erfolgreich durchgeführt werden, da Teile der Pellets unbesiedelt blieben.

Die Ergebnisse zeigen, dass einerseits ein großes Potential in der Herstellung von autologen Transplantaten für die Trachealrekonstruktion besteht, andererseits müssen noch weitere Studien folgen, um die Probleme der Redifferenzierung der respiratorischen Epithelzellen zu lösen.

7 Literaturverzeichnis

- [1] Sittering, M.; Bujia, J.; Rotter, N.; Reitzel, D.; Minuth, W. W. und Burmester, G. R. (1996): Tissue engineering and autologous transplant formation: practical approaches with resorbable biomaterials and new cell culture techniques, *Biomaterials* (Band 17), Nr. 3, Seite 237-42. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8745320
- [2] Terada, S.; Sato, M.; Sevy, A. und Vacanti, J. P. (2000): Tissue engineering in the twenty-first century, *Yonsei Med J* (Band 41), Nr. 6, Seite 685-91. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11204820
- [3] Rotter, N.; Aigner, J.; Naumann, A.; Hammer, C. und Sittering, M. (1999): Behavior of tissue-engineered human cartilage after transplantation into nude mice, *J Mater Sci Mater Med* (Band 10), Nr. 10/11, Seite 689-93. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15347987
- [4] Sittering, M.; Perka, C.; Schultz, O.; Haupl, T. und Burmester, G. R. (1999): Joint cartilage regeneration by tissue engineering, *Z Rheumatol* (Band 58), Nr. 3, Seite 130-5. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10441839
- [5] Seol, Y. J.; Lee, J. Y.; Park, Y. J.; Lee, Y. M.; Young, Ku; Rhyu, I. C.; Lee, S. J.; Han, S. B. und Chung, C. P. (2004): Chitosan sponges as tissue engineering scaffolds for bone formation, *Biotechnol Lett* (Band 26), Nr. 13, Seite 1037-41. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15218375
- [6] Freed, L. E.; Vunjak-Novakovic, G.; Biron, R. J.; Eagles, D. B.; Lesnoy, D. C.; Barlow, S. K. und Langer, R. (1994): Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering, *Biotechnology (N Y)* (Band 12), Nr. 7, Seite 689-93. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7764913
- [7] Chu, C. R.; Coutts, R. D.; Yoshioka, M.; Harwood, F. L.; Monosov, A. Z. und Amiel, D. (1995): Articular cartilage repair using allogeneic perichondrocyte-seeded biodegradable porous polylactic acid (PLA): a tissue-engineering study, *J Biomed Mater Res* (Band 29), Nr. 9, Seite 1147-54. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8567713

- [8] Moran, J. M.; Pazzano, D. und Bonassar, L. J. (2003): Characterization of polylactic acid-polyglycolic acid composites for cartilage tissue engineering, *Tissue Eng* (Band 9), Nr. 1, Seite 63-70. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12625955
- [9] Haisch, A.; Klaring, S.; Groger, A.; Gebert, C. und Sittering, M. (2002): A tissue-engineering model for the manufacture of auricular-shaped cartilage implants, *Eur Arch Otorhinolaryngol* (Band 259), Nr. 6, Seite 316-21. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12115080
- [10] Hutmacher, D. W.; Ng, K. W.; Kaps, C.; Sittering, M. und Klaring, S. (2003): Elastic cartilage engineering using novel scaffold architectures in combination with a biomimetic cell carrier, *Biomaterials* (Band 24), Nr. 24, Seite 4445-58. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12922155
- [11] Yang, C.; Hillas, P. J.; Baez, J. A.; Nokelainen, M.; Balan, J.; Tang, J.; Spiro, R. und Polarek, J. W. (2004): The application of recombinant human collagen in tissue engineering, *BioDrugs* (Band 18), Nr. 2, Seite 103-19. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15046526
- [12] Ogawa, K.; Ochoa, E. R.; Borenstein, J.; Tanaka, K. und Vacanti, J. P. (2004): The generation of functionally differentiated, three-dimensional hepatic tissue from two-dimensional sheets of progenitor small hepatocytes and nonparenchymal cells, *Transplantation* (Band 77), Nr. 12, Seite 1783-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15223892
- [13] Minuth, W. W.; Sorokin, L. und Schumacher, K. (2004): Generation of renal tubules at the interface of an artificial interstitium, *Cell Physiol Biochem* (Band 14), Nr. 4-6, Seite 387-94. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15319542
- [14] Vacanti, C. A.; Paige, K. T.; Kim, W. S.; Sakata, J.; Upton, J. und Vacanti, J. P. (1994): Experimental tracheal replacement using tissue-engineered cartilage, *J Pediatr Surg* (Band 29), Nr. 2, Seite 201-4; discussion 204-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8176592

- [15] Sakata, J.; Vacanti, C. A.; Schloo, B.; Healy, G. B.; Langer, R. und Vacanti, J. P. (1994): Tracheal composites tissue engineered from chondrocytes, tracheal epithelial cells, and synthetic degradable scaffolding, *Transplant Proc* (Band 26), Nr. 6, Seite 3309-10. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=7998148
- [16] Kojima, K.; Bonassar, L. J.; Roy, A. K.; Vacanti, C. A. und Cortiella, J. (2002): Autologous tissue-engineered trachea with sheep nasal chondrocytes, *J Thorac Cardiovasc Surg* (Band 123), Nr. 6, Seite 1177-84. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12063466
- [17] Bucheler, M.; Scheffler, B.; von Foerster, U.; Bruinink, A.; Bootz, F. und Wintermantel, E. (2000): Growth of human respiratory epithelium on collagen foil, *Laryngorhinootologie* (Band 79), Nr. 3, Seite 160-4. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=10763174
- [18] Biesalski, H. K. und Nohr, D. (2003): Importance of vitamin-A for lung function and development, *Mol Aspects Med* (Band 24), Nr. 6, Seite 431-40. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14585314
- [19] Delplanque, A.; Coraux, C.; Tirouvanziam, R.; Khazaal, I.; Puchelle, E.; Ambros, P.; Gaillard, D. und Peault, B. (2000): Epithelial stem cell-mediated development of the human respiratory mucosa in SCID mice, *J Cell Sci* (Band 113 (Pt 5)), Seite 767-78. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10671367
- [20] Evans, M. J.; Van Winkle, L. S.; Fanucchi, M. V. und Plopper, C. G. (2001): Cellular and molecular characteristics of basal cells in airway epithelium, *Exp Lung Res* (Band 27), Nr. 5, Seite 401-15. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11480582
- [21] Evans, M. J. und Moller, P. C. (1991): Biology of airway basal cells, *Exp Lung Res* (Band 17), Nr. 3, Seite 513-31. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=1860451
- [22] Inayama, Y.; Hook, G. E.; Brody, A. R.; Cameron, G. S.; Jetten, A. M.; Gilmore, L. B.; Gray, T. und Nettesheim, P. (1988): The differentiation potential of tracheal basal cells, *Lab Invest* (Band 58), Nr. 6, Seite 706-17. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3379917

- [23] Ziegelaar, B. W.; Aigner, J.; Staudenmaier, R.; Lempart, K.; Mack, B.; Happ, T.; Sittinger, M.; Endres, M.; Naumann, A.; Kastenbauer, E. und Rotter, N. (2002): The characterisation of human respiratory epithelial cells cultured on resorbable scaffolds: first steps towards a tissue engineered tracheal replacement, *Biomaterials* (Band 23), Nr. 6, Seite 1425-38. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11829438
- [24] Hassid, S.; Salmon, I.; Brugmans, M.; Dawance, S.; Kiss, R.; Gabius, H. J. und Danguy, A. (1997): Histochemical study of the epithelia of nasal polyps by biotinylated lectins and neoglycoprotein. A comparison with the normal human respiratory epithelium, *Eur J Morphol* (Band 35), Nr. 2, Seite 79-86. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9253585
- [25] Hicks, W., Jr.; Hall, L., 3rd; Sigurdson, L.; Stewart, C.; Hard, R.; Winston, J. und Lwebuga-Mukasa, J. (1997): Isolation and characterization of basal cells from human upper respiratory epithelium, *Exp Cell Res* (Band 237), Nr. 2, Seite 357-63. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=9434631
- [26] Stosiek, P.; Kasper, M. und Moll, R. (1992): Changes in cytokeratin expression accompany squamous metaplasia of the human respiratory epithelium, *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* (Band 421), Nr. 2, Seite 133-41. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1381128
- [27] Moll, R.; Franke, W. W.; Schiller, D. L.; Geiger, B. und Krepler, R. (1982): The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells, *Cell* (Band 31), Nr. 1, Seite 11-24. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6186379
- [28] Stevens, A. und Lowe, J. (1992): *Lehrbuch Histologie*, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, ISBN: 3-527-15511-2.
- [29] Junqueira, L.C.; Carneiro, J.; Kelly, R.O. und Gratzl, M. (2002): *Histologie*, 5. Auflage, Springer Verlag, Berlin, ISBN: 3-540-41858.
- [30] Rohen, J.W. (1994): *Funktionelle Anatomie des Menschen*, 8. Auflage, Schattauer Verlag, Stuttgart, New York, ISBN: 3-7945-1670-2.
- [31] Bucher, O (1997): *Cytologie. Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen* (Band 12. Auflage), Verlag Hans Huber, Bern.

- [32] Evans, M. J.; Cox, R. A.; Shami, S. G.; Wilson, B. und Plopper, C. G. (1989): The role of basal cells in attachment of columnar cells to the basal lamina of the trachea, *Am J Respir Cell Mol Biol* (Band 1), Nr. 6, Seite 463-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=2637758
- [33] Christensen, T. G.; Breuer, R.; Hornstra, L. J.; Lucey, E. C. und Snider, G. L. (1987): The ultrastructure of hamster bronchial epithelium, *Exp Lung Res* (Band 13), Nr. 3, Seite 253-77. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=3691409
- [34] Schiebler, TH (1996): *Histologie: Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen unter Berücksichtigung der Histophysiologie* (Band 3. Auflage), Springer Verlag, Berlin Heidelberg.
- [35] Puchelle, E. und Peault, B. (2000): Human airway xenograft models of epithelial cell regeneration, *Respir Res* (Band 1), Nr. 3, Seite 125-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=11667974
- [36] Cull, D. L.; Lally, K. P.; Mair, E. A.; Daidone, M. und Parsons, D. S. (1990): Tracheal reconstruction with polytetrafluoroethylene graft in dogs, *Ann Thorac Surg* (Band 50), Nr. 6, Seite 899-901. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2241381
- [37] Olze, H.; Kaschke, O. und Muller, W. D. (1997): Improving the design of an alloplastic epithelialized tracheal prosthesis, *Hno* (Band 45), Nr. 6, Seite 453-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9324499
- [38] Kon, M. und van den Hooff, A. (1983): Cartilage tube formation by perichondrium: a new concept for tracheal reconstruction, *Plast Reconstr Surg* (Band 72), Nr. 6, Seite 791-7. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=6647602
- [39] Fuchs, J. R.; Nasser, B. A. und Vacanti, J. P. (2001): Tissue engineering: a 21st century solution to surgical reconstruction, *Ann Thorac Surg* (Band 72), Nr. 2, Seite 577-91. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=11515900

- [40] Chopra, D. P.; Kern, R. C.; Mathieu, P. A. und Jacobs, J. R. (1992): Successful in vitro growth of human respiratory epithelium on a tracheal prosthesis, *Laryngoscope* (Band 102), Nr. 5, Seite 528-31. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=1533434
- [41] Grillo, H. C. (2002): Tracheal replacement: a critical review, *Ann Thorac Surg* (Band 73), Nr. 6, Seite 1995-2004. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=12078821
- [42] Jacobs, J. R. (1988): Investigations into tracheal prosthetic reconstruction, *Laryngoscope* (Band 98), Nr. 11, Seite 1239-45. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2972893
- [43] Fonkalsrud, E. W. und Sumida, S. (1971): Tracheal replacement with autologous esophagus for tracheal stricture, *Arch Surg* (Band 102), Nr. 2, Seite 139-42. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=5101330
- [44] Har-El, G.; Krespi, Y. P. und Goldsher, M. (1989): The combined use of muscle flaps and alloplasts for tracheal reconstruction, *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* (Band 115), Nr. 11, Seite 1310-3. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=2803711
- [45] Cohen, R. C.; Filler, R. M.; Konuma, K.; Bahoric, A.; Kent, G. und Smith, C. (1985): The successful reconstruction of thoracic tracheal defects with free periosteal grafts, *J Pediatr Surg* (Band 20), Nr. 6, Seite 852-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=4087112
- [46] Sabas, A. A.; Uez, J. B.; Rojas, O.; Inones, A. und Aranguren, J. A. (1977): Replacement of the trachea with dura mater. Experimental work, *J Thorac Cardiovasc Surg* (Band 74), Nr. 5, Seite 761-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=916716
- [47] Berghaus, A.; Stange, T. und Schwarz, E.M. (2001): Nasenhöhle im Querschnitt, Internet, <http://www2.lifeline.de/yavivo/Verfahren/HNO/Nasenmuschelhyperplasie/05Einleitung/05Nasenmuschelhyperplasie.html>
- [48] Arnold, W. und Ganzer, U. (1997): Checkliste Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, 2. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart, New York, ISBN: 3-13-103411-4.

- [49] Fahy, J. V. (2001): Remodeling of the airway epithelium in asthma, *Am J Respir Crit Care Med* (Band 164), Nr. 10 Pt 2, Seite S46-51. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=11734466
- [50] Jorissen, M.; Van der Schueren, B.; Van den Berghe, H. und Cassiman, J. J. (1991): Contribution of in vitro culture methods for respiratory epithelial cells to the study of the physiology of the respiratory tract, *Eur Respir J* (Band 4), Nr. 2, Seite 210-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=2044738
- [51] Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE (1996): *Biomaterials Science*, Academic Press.
- [52] Adler, K. B.; Cheng, P. W. und Kim, K. C. (1990): Characterization of guinea pig tracheal epithelial cells maintained in biphasic organotypic culture: cellular composition and biochemical analysis of released glycoconjugates, *Am J Respir Cell Mol Biol* (Band 2), Nr. 2, Seite 145-54. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=2306371
- [53] Yamaya, M.; Finkbeiner, W. E.; Chun, S. Y. und Widdicombe, J. H. (1992): Differentiated structure and function of cultures from human tracheal epithelium, *Am J Physiol* (Band 262), Nr. 6 Pt 1, Seite L713-24. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=1616056
- [54] Lechner, J. F.; Haugen, A.; McClendon, I. A. und Pettis, E. W. (1982): Clonal growth of normal adult human bronchial epithelial cells in a serum-free medium, *In Vitro* (Band 18), Nr. 7, Seite 633-42. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=7141447
- [55] Prunieras, M.; Regnier, M. und Woodley, D. (1983): Methods for cultivation of keratinocytes with an air-liquid interface, *J Invest Dermatol* (Band 81), Nr. 1 Suppl, Seite 28s-33s. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6190962
- [56] Yoon, J. H.; Kim, K. S.; Kim, S. S.; Lee, J. G. und Park, I. Y. (2000): Secretory differentiation of serially passaged normal human nasal epithelial cells by retinoic acid: expression of mucin and lysozyme, *Ann Otol Rhinol Laryngol* (Band 109), Nr. 6, Seite 594-601. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10855573

- [57] Usui, S.; Shimizu, T.; Kishioka, C.; Fujita, K. und Sakakura, Y. (2000): Secretory cell differentiation and mucus secretion in cultures of human nasal epithelial cells: use of a monoclonal antibody to study human nasal mucin, *Ann Otol Rhinol Laryngol* (Band 109), Nr. 3, Seite 271-7. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=10737310
- [58] Cohn, L. A. und Adler, K. B. (1991): In vitro studies of mechanisms of lung injury in the rodent, *Toxicol Pathol* (Band 19), Nr. 4 Pt 1, Seite 419-27. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=1813986
- [59] Bernacki, S. H.; Nelson, A. L.; Abdullah, L.; Sheehan, J. K.; Harris, A.; William Davis, C. und Randell, S. H. (1999): Mucin gene expression during differentiation of human airway epithelia in vitro. Muc4 and muc5b are strongly induced, *Am J Respir Cell Mol Biol* (Band 20), Nr. 4, Seite 595-604. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=10100990
- [60] Bals, R.; Xiao, W.; Sang, N.; Weiner, D. J.; Meegalla, R. L. und Wilson, J. M. (1999): Transduction of well-differentiated airway epithelium by recombinant adeno-associated virus is limited by vector entry, *J Virol* (Band 73), Nr. 7, Seite 6085-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=10364362
- [61] Moll, R. und Franke, W. W. (1982): Intermediate filaments and their interaction with membranes. The desmosome-cytokeratin filament complex and epithelial differentiation, *Pathol Res Pract* (Band 175), Nr. 2-3, Seite 146-61. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6190143
- [62] Cooper, D.; Schermer, A. und Sun, T. T. (1985): Classification of human epithelia and their neoplasms using monoclonal antibodies to keratins: strategies, applications, and limitations, *Lab Invest* (Band 52), Nr. 3, Seite 243-56. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2579289
- [63] Purkis, P. E.; Steel, J. B.; Mackenzie, I. C.; Nathrath, W. B.; Leigh, I. M. und Lane, E. B. (1990): Antibody markers of basal cells in complex epithelia, *J Cell Sci* (Band 97 (Pt 1)), Seite 39-50. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1701769

- [64] Otto, W. R. (2002): Lung epithelial stem cells, J Pathol (Band 197), Nr. 4, Seite 527-35. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=12115868
- [65] Boers, J. E.; Ambergen, A. W. und Thunnissen, F. B. (1998): Number and proliferation of basal and parabasal cells in normal human airway epithelium, Am J Respir Crit Care Med (Band 157), Nr. 6 Pt 1, Seite 2000-6. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=9620938
- [66] Jetten, A. M.; George, M. A.; Smits, H. L. und Vollberg, T. M. (1989): Keratin 13 expression is linked to squamous differentiation in rabbit tracheal epithelial cells and down-regulated by retinoic acid, Exp Cell Res (Band 182), Nr. 2, Seite 622-34. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2470609
- [67] Brezillon, S.; Dupuit, F.; Hinnrasky, J.; Marchand, V.; Kalin, N.; Tummler, B. und Puchelle, E. (1995): Decreased expression of the CFTR protein in remodeled human nasal epithelium from non-cystic fibrosis patients, Lab Invest (Band 72), Nr. 2, Seite 191-200. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7531792
- [68] Mueller, H.J. (2001): PCR-Polymerase-Kettenreaktion, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, ISBN: 3-8274-1058-4.
- [69] Holland, P. M.; Abramson, R. D.; Watson, R. und Gelfand, D. H. (1991): Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase, Proc Natl Acad Sci U S A (Band 88), Nr. 16, Seite 7276-80. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1871133
- [70] Lodish, H; Berk, A; Zipursky, SL; Matsudaira, P; MBaltimore, D und Danrnell, JE (2000): Molecular Cell Biology, 4th. Auflage, W.H. Freeman & Co., New York.
- [71] Heid, C. A.; Stevens, J.; Livak, K. J. und Williams, P. M. (1996): Real time quantitative PCR, Genome Res (Band 6), Nr. 10, Seite 986-94. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8908518
- [72] Neusser, M (2000): Echtzeit-PCR-Verfahren zur Quantifizierung von PCR-Produkten, Laborwelt (Band 2).
- [73] (2004): PCR, 26.08.2003, <http://www.pcr.at/html/mbldcy.html>

- [74] Winer, J.; Jung, C. K.; Shackel, I. und Williams, P. M. (1999): Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro, Anal Biochem (Band 270), Nr. 1, Seite 41-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10328763
- [75] Omerod, MG (1990): Flow Cytometrie: A practical approach., Oxford University Press, Oxford.
- [76] BD (2003): Guide BU BD User Guide LSRII
- [77] Nebe, C.T. (2001): Auszug aus Prinzipien und Techniken der Immunfluoreszenz, Heidelberg, http://www.ma.uni-heidelberg.de/inst/ikc/handbuch/kursbuch_auszug.htm
- [78] Janeway, C.A.; Travers, P.; Walport, M. und Shlomchik, M. (2001): Immunobiology, 5. Auflage, Garland Publishing, New York, London.
- [79] Jorissen, M.; Van der Schueren, B.; Van den Berghe, H. und Cassiman, J. J. (1989): The preservation and regeneration of cilia on human nasal epithelial cells cultured in vitro, Arch Otorhinolaryngol (Band 246), Nr. 5, Seite 308-14. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=2590043
- [80] Chomczynski, P. und Sacchi, N. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, Anal Biochem (Band 162), Nr. 1, Seite 156-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=2440339
- [81] Chomczynski, P. (1993): A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples, Biotechniques (Band 15), Nr. 3, Seite 532-4, 536-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=7692896
- [82] Coraux, C.; Delplanque, A.; Hinnrasky, J.; Peault, B.; Puchelle, E. und Gaillard, D. (1998): Distribution of integrins during human fetal lung development, J Histochem Cytochem (Band 46), Nr. 7, Seite 803-10. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9632739
- [83] (1993): United States National Library of Medicine, 03.01.2005, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- [84] NCBI Blast Search, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>

- [85] Kaps, C.; Fuchs, S.; Endres, M.; Vetterlein, S.; Krenn, V.; Perka, C. und Sittinger, M. (2004): Molecular characterization of tissue-engineered articular chondrocyte transplants based on resorbable polymer fleece, *Orthopade* (Band 33), Nr. 1, Seite 76-85. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14747914
- [86] ten Hallers, E. J.; Rakhorst, G.; Marres, H. A.; Jansen, J. A.; van Kooten, T. G.; Schutte, H. K.; van Loon, J. P.; van der Houwen, E. B. und Verkerke, G. J. (2004): Animal models for tracheal research, *Biomaterials* (Band 25), Nr. 9, Seite 1533-43. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14697856
- [87] Cavadas, P. C.; Bonanad, E.; Baena-Montilla, P. und Vera-Sempere, F. J. (1996): Prefabrication of a free flap for tracheal reconstruction: an experimental study. Preliminary report, *Plast Reconstr Surg* (Band 98), Nr. 6, Seite 1052-62. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8911476
- [88] Schultz, P.; Vautier, D.; Chluba, J.; Marcellin, L. und Debry, C. (2002): Survival analysis of rats implanted with porous titanium tracheal prosthesis, *Ann Thorac Surg* (Band 73), Nr. 6, Seite 1747-51. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12078764
- [89] Korpela, A.; Aarnio, P.; Sariola, H.; Tormala, P. und Harjula, A. (1999): Bioabsorbable self-reinforced poly-L-lactide, metallic, and silicone stents in the management of experimental tracheal stenosis, *Chest* (Band 115), Nr. 2, Seite 490-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10027451
- [90] Wechselberger, G.; Russell, R. C.; Neumeister, M. W.; Schoeller, T.; Piza-Katzer, H. und Rainer, C. (2002): Successful transplantation of three tissue-engineered cell types using capsule induction technique and fibrin glue as a delivery vehicle, *Plast Reconstr Surg* (Band 110), Nr. 1, Seite 123-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12087242
- [91] Kim, J.; Suh, S. W.; Shin, J. Y.; Kim, J. H.; Choi, Y. S. und Kim, H. (2004): Replacement of a tracheal defect with a tissue-engineered prosthesis: early results from animal experiments, *J Thorac Cardiovasc Surg* (Band 128), Nr. 1, Seite 124-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15224031

- [92] Kamil, S. H.; Eavey, R. D.; Vacanti, M. P.; Vacanti, C. A. und Hartnick, C. J. (2004): Tissue-engineered cartilage as a graft source for laryngotracheal reconstruction: a pig model, Arch Otolaryngol Head Neck Surg (Band 130), Nr. 9, Seite 1048-51. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15381591
- [93] Kojima, K.; Ignatz, R. A.; Kushibiki, T.; Tinsley, K. W.; Tabata, Y. und Vacanti, C. A. (2004): Tissue-engineered trachea from sheep marrow stromal cells with transforming growth factor beta2 released from biodegradable microspheres in a nude rat recipient, J Thorac Cardiovasc Surg (Band 128), Nr. 1, Seite 147-53. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15224034
- [94] Risbud, M.; Endres, M.; Ringe, J.; Bhonde, R. und Sittering, M. (2001): Biocompatible hydrogel supports the growth of respiratory epithelial cells: possibilities in tracheal tissue engineering, J Biomed Mater Res (Band 56), Nr. 1, Seite 120-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11309798
- [95] Coraux, C.; Nawrocki-Raby, B.; Hinnrasky, J.; Kileztky, C.; Gaillard, D.; Dani, C. und Puchelle, E. (2004): Embryonic Stem Cells Generate Airway Epithelial Tissue, Am J Respir Cell Mol Biol. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15576671
- [96] Delaere, P. R. und Hardillo, J. (2003): Tubes of vascularized cartilage used for replacement of rabbit cervical trachea, Ann Otol Rhinol Laryngol (Band 112), Nr. 9 Pt 1, Seite 807-12. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14535566
- [97] Bucheler, M. und Haisch, A. (2003): Tissue engineering in otorhinolaryngology, DNA Cell Biol (Band 22), Nr. 9, Seite 549-64. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14577908
- [98] Becton; Dickinson und Company, http://www.bdbiosciences.com/discovery_labware/Products/cell_environments_and_ECMs/extracellular_matrix/dispase/
- [99] Minuth, W. W.; Aigner, J.; Kubat, B. und Kloth, S. (1997): Improved differentiation of renal tubular epithelium in vitro: potential for tissue engineering, Exp Nephrol (Band 5), Nr. 1, Seite 10-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9052843

- [100] Jorissen, M. und Bessems, A. (1995): Normal ciliary beat frequency after ciliogenesis in nasal epithelial cells cultured sequentially as monolayer and in suspension, *Acta Otolaryngol* (Band 115), Nr. 1, Seite 66-70. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7762388
- [101] Rautiainen, M.; Matsune, S.; Yoshitsugu, M. und Ohyama, M. (1993): Degeneration of human respiratory cell ciliary beat in monolayer cell cultures, *Eur Arch Otorhinolaryngol* (Band 250), Nr. 2, Seite 97-100. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8507473
- [102] Bohnert, A.; Hornung, J.; Mackenzie, I. C. und Fusenig, N. E. (1986): Epithelial-mesenchymal interactions control basement membrane production and differentiation in cultured and transplanted mouse keratinocytes, *Cell Tissue Res* (Band 244), Nr. 2, Seite 413-29. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2424607
- [103] Jackson, A. D.; Rayner, C. F.; Dewar, A.; Cole, P. J. und Wilson, R. (1996): A human respiratory-tissue organ culture incorporating an air interface, *Am J Respir Crit Care Med* (Band 153), Nr. 3, Seite 1130-5. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8630556
- [104] Aufderheide, M.; Ritter, D.; Knebel, J. W. und Scherer, G. (2001): A method for in vitro analysis of the biological activity of complex mixtures such as sidestream cigarette smoke, *Exp Toxicol Pathol* (Band 53), Nr. 2-3, Seite 141-52. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11484832
- [105] Rhee, C. S.; Min, Y. G.; Lee, C. H.; Kwon, T. Y.; Yi, W. J. und Park, K. S. (2001): Ciliary beat frequency in cultured human nasal epithelial cells, *Ann Otol Rhinol Laryngol* (Band 110), Nr. 11, Seite 1011-6. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11713910
- [106] Inayama, Y.; Hook, G. E.; Brody, A. R.; Jetten, A. M.; Gray, T.; Mahler, J. und Nettesheim, P. (1989): In vitro and in vivo growth and differentiation of clones of tracheal basal cells, *Am J Pathol* (Band 134), Nr. 3, Seite 539-49. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2923184

- [107] McDowell, E. M.; Ben, T.; Newkirk, C.; Chang, S. und De Luca, L. M. (1987): Differentiation of tracheal mucociliary epithelium in primary cell culture recapitulates normal fetal development and regeneration following injury in hamsters, *Am J Pathol* (Band 129), Nr. 3, Seite 511-22. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3425690
- [108] Emura, M. (1997): Stem cells of the respiratory epithelium and their in vitro cultivation, *In Vitro Cell Dev Biol Anim* (Band 33), Nr. 1, Seite 3-14. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9028828
- [109] Hong, K. U.; Reynolds, S. D.; Watkins, S.; Fuchs, E. und Stripp, B. R. (2004): Basal cells are a multipotent progenitor capable of renewing the bronchial epithelium, *Am J Pathol* (Band 164), Nr. 2, Seite 577-88. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14742263
- [110] Hong, K. U.; Reynolds, S. D.; Watkins, S.; Fuchs, E. und Stripp, B. R. (2004): In vivo differentiation potential of tracheal basal cells: evidence for multipotent and unipotent subpopulations, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* (Band 286), Nr. 4, Seite L643-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12871857
- [111] Dorscheid, D. R.; Conforti, A. E.; Hamann, K. J.; Rabe, K. F. und White, S. R. (1999): Characterization of cell surface lectin-binding patterns of human airway epithelium, *Histochem J* (Band 31), Nr. 3, Seite 145-51. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10421413
- [112] Bals, R. und Welsch, U. (1997): Lectins and antibodies to blood group antigens as markers for the basal cells of the human respiratory epithelium, *Microsc Res Tech* (Band 38), Nr. 5, Seite 505-11. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9376654
- [113] Lackie, P. M.; Baker, J. E.; Gunthert, U. und Holgate, S. T. (1997): Expression of CD44 isoforms is increased in the airway epithelium of asthmatic subjects, *Am J Respir Cell Mol Biol* (Band 16), Nr. 1, Seite 14-22. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8998074

- [114] Kasper, M.; Gunthert, U.; Dall, P.; Kayser, K.; Schuh, D.; Haroske, G. und Muller, M. (1995): Distinct expression patterns of CD44 isoforms during human lung development and in pulmonary fibrosis, *Am J Respir Cell Mol Biol* (Band 13), Nr. 6, Seite 648-56. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7576702
- [115] Smolian, H.; Thiele, S.; Kolkenbrock, H.; Zacher, J.; Aicher, W.; Schultz, O.; Burmester, G. R. und Sittinger, M. (2001): Establishment of an in vitro model for rheumatoid arthritis as test system for therapeutical substances, *Altex* (Band 18), Nr. 4, Seite 265-80. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11753539
- [116] Goto, Y.; Noguchi, Y.; Nomura, A.; Sakamoto, T.; Ishii, Y.; Bitoh, S.; Picton, C.; Fujita, Y.; Watanabe, T.; Hasegawa, S. und Uchida, Y. (1999): In vitro reconstitution of the tracheal epithelium, *Am J Respir Cell Mol Biol* (Band 20), Nr. 2, Seite 312-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9922223
- [117] Million, K.; Tournier, F.; Houcine, O.; Ancian, P.; Reichert, U. und Marano, F. (2001): Effects of retinoic acid receptor-selective agonists on human nasal epithelial cell differentiation, *Am J Respir Cell Mol Biol* (Band 25), Nr. 6, Seite 744-50. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11726401
- [118] Chang, W. H.; Reddy, S. P.; Di, Y. P.; Yoneda, K.; Harper, R. und Wu, R. (2002): Regulation of thioredoxin gene expression by vitamin A in human airway epithelial cells, *Am J Respir Cell Mol Biol* (Band 26), Nr. 5, Seite 627-35. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11970916
- [119] Berghaus, A; Rettinger, G und Böhme, G (1996): Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Hippokrates Verlag, Duale Reihe, Stuttgart, ISBN: 3-7773-0944-3.

Eidesstattliche Erklärung:

Die Dissertation wurde von mir und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst.
Auch in Teilen stellt sie keine Kopie anderer Arbeiten dar. Die benutzten
Hilfsmittel sowie die Literatur sind vollständig angegeben.

Berlin, den 4. Februar 2005

Michaela Endres

Curriculum Vitae:

Michaela Endres

07.07.1973

Geburt in Leverkusen

Schulausbildung:

08/1985 - 06/1992

Bertha von Suttner Gymnasium in Berlin

06/1992

Erwerb der allgemeinen Hochschulreife

Ausbildung:

02/1993 - 02/1995

Lette Verein Berlin

02/1995

Technische Assistentin für Chemische und Biologische Laboratorien

Hochschulen:

04/1995 - 04/1999

Technische Fachhochschule Berlin

04/1999

Dipl. Ing. Biotechnologie

07/1999 - 05/2004

Technische Mitarbeiterin im interdisziplinären Labor für Tissue Engineering; Med. Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und Klinische Immunologie; Charité-Universitätsmedizin Berlin

seit 06/2004

Wissenschaftliche Fachkraft; Bereich Forschung und Entwicklung TransTissue Technologies GmbH; Berlin

seit 02/2002

HU-Berlin, Medizinische Fakultät
Promotionsarbeit im interdisziplinären Labor für Tissue Engineering; Med. Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und Klinische Immunologie; Charité-Universitätsmedizin Berlin

Auslandsaufenthalt:

01/2001 - 07/2001

Laboratory for Biomedical Engineering; Center for Biomedical Applications and Technology; Mechanical and Production Engineering Department; National University of Singapore